

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

Τμήμα ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Κλωνοποίηση του Μεταγραφικού Παράγοντα AP2α & Μελέτη της
Σουμοϋλίωσής του σε συνθήκες υποξίας»**

Μπασαγιάννη Αγγελική

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- Γεωργία Χαχάμη, Λέκτορας Κυτταρικής Βιοχημείας, Επιβλέπουσα
- Ηλίας Μυλωνής, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας
- Αναστάσιος Γερμενής, Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας

Διπλωματική Εργασία υποβληθείσα στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ως μέρους των απαιτήσεων για την απόκτηση Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στη Βιοχημεία

Λάρισα, Οκτώβριος 2015

UNIVERSITY OF THESSALY

SCHOOL OF HEALTH SCIENCE
FACULTY OF MEDICINE



MASTER PROGRAM IN

“CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE”

MASTER THESIS

**« Cloning of the Transcription Factor AP2 α & Investigation of his Sumoylation
under hypoxic conditions»**

Basagianni Angeliki

Advisory Thesis Committee:

- Chachami Georgia, Lecturer of Cellular Biochemistry, supervisor
- Ilias Mylonis, Assistant Professor of Biochemistry
- Anastasios Germanis, Professor of Laboratory Immunology

Master Thesis submitted to the Faculty of Medicine of the University of Thessaly in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Biochemistry

Larissa, October 2015

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	7
ABSTRACT.....	8
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1.1 ΥΠΟΞΙΑ.....	9
1.1.1 Ομοιοστασία κυττάρων σε χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου (υποξία).....	9
1.1.2 Γονίδια στόχοι της υποξίας.....	9
1.1.3 Η οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων HIF.....	10
1.1.4 Ρύθμιση του επαγόμενου από την υποξία παράγοντα HIF.....	12
1.2 ΣΟΥΜΟΥΛΙΩΣΗ.....	14
1.2.1 Γενικά χαρακτηριστικά της σουμουλίωσης.....	14
1.2.2 Μηχανισμός σουμουλίωσης.....	16
1.2.3 Περιοχές αλληλεπίδρασης με SUMO (SUMO Interaction Motif, SIM).....	17
1.2.4 Ο ρόλος της σουμουλίωσης στο κύτταρο.....	18
1.2.5 Αλλαγές στο γενικό πρότυπο σουμουλίωσης σε συνθήκες στρες.....	19
1.2.6 Σουμουλίωση και HIF.....	20
1.2.7 Ο ρόλος της σουμουλίωσης στην υποξία: Προκαταρκτικά πειράματα (ZMBH- Πανεπιστήμιο Χαιδελβέργης και Εργαστήριο Βιοχημείας Ιατρική Λάρισας).....	21
1.3 Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ AP2.....	23
1.3.1 Γονίδια στόχοι των AP2.....	24
1.3.2 AP2α και υποξία.....	25
2 ΣΚΟΠΟΣ.....	27
3 ΥΛΙΚΑ.....	28
3.1 Χημικά αντιδραστήρια.....	28
3.2 Ένζυμα και υλικά μοριακής βιολογίας.....	28
3.3 Βακτηριακά στελέχη.....	28
3.4 Κυτταρικές σειρές.....	28
3.5 Υλικά κυτταροκαλλιέργειας.....	28
3.6 Πλασμίδια.....	28

3.6.1	pcDNA-AP2a wt & pcDNA-AP2a mut.....	28
3.6.2	pcDNA 3.1-HA	29
3.6.3	pDsRed-Monomer-C1 Vector (ClonTech Laboratories, Inc.).....	29
3.6.4	pcDNA-His-SUMO2	30
3.7	Εκκινητές	30
3.8	Αντισώματα.....	31
4	ΜΕΘΟΔΟΙ	32
4.1	Παρασκευή βακτηρίων δεκτικών σε μετασχηματισμό με πλασμιδιακό DNA	32
4.2	Ενίσχυση γονιδιακής αλληλουχίας του AP2a wt και AP2a mut με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).	32
4.3	Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης	34
4.4	Απομόνωση DNA απο πηκτή αγαρόζης με χρήση εμπορικού kit.	34
4.5	Πέψη πλασμιδιακού DNA με ένζυμα περιορισμού.....	35
4.6	Καθαρισμός DNA προϊόντος με χρήση εμπορικού kit.	35
4.7	Αντίδραση λιγάσης.....	36
4.8	Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων E.Coli με πλασμιδιακό φορέα	36
4.9	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας με αλκαλική λύση	36
4.10	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μεσαίας κλίμακας με χρήση εμπορικού kit.	37
4.11	Καλλιέργεια ανθρώπινων καρκινικών κυττάρικων σειρών	38
4.12	Πάγωμα κυττάρων και επανέναρξη καλλιιεργειών.....	38
4.13	Παροδική διαμόλυνση κυττάρων με ανασυνδυασμένα πλασμίδια, με τη βοήθεια κατιονικών μορίων	38
4.14	Παρασκευή πρωτεϊνικού κυτταρικού εκχυλίσματος	39
4.15	Ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός και ανάλυση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου κάτω απο μετουσιωτικές συνθήκες (SDS-PAGE)	39
4.16	Αποτύπωση και ανοσοανίχνευση πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Western Blotting)	41
4.17	Ανοσοκατακρήμνιση	42
4.18	Εμμεσος ανοσοφθορισμός.....	43

5	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	45
5.1	Έλεγχος των πλασμιδιακών κατασκευών pcDNA3.1-AP2α wt & pcDNA3.1-AP2α mut 45	
5.1.1	Έλεγχος της έκφρασης και του υποκυττάριου εντοπισμού των υπερεκφρασμένων AP2α wt και AP2α mut σε κύτταρα HeLa.....	45
5.2	Κλωνοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα AP2α-wt & AP2α-mut σε πλασμιδιακό φορέα pcDNA3.1-HA.	47
5.2.1	Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR).....	47
5.2.2	Πέψη των DNA με περιοριστικά ένζυμα και αντίδραση λιγάσης.	48
5.2.3	Μετασχηματισμός βακτηρίων E.Coli με τις πλασμιδιακές κατασκευές pcDNA3.1-HA-AP2α wt και pcDNA3.1-HA-AP2α mut & Απομόνωση του πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα.	48
5.2.4	Επιβεβαίωση του σωστού ενθέματος με πολλαπλές πέψεις με περιοριστικές ενδονουκλεάσες & Απομόνωση μεσαίας κλίμακας των ανασυνδιασμένων πλασμιδιακών DNA: pcDNA 3.1-HA-AP2α wt και pcDNA 3.1-HA-AP2α mut.....	50
5.3	Έλεγχος της έκφρασης και του υποκυττάριου εντοπισμού των HA-AP2α wt και HA-AP2α mut σε κύτταρα HeLa σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας.....	52
5.4	Έλεγχος της σουμυλίωσης του HA-AP2α wt και HA-AP2α mut σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας.....	55
5.4.1	Ανοσοκατακρήμνιση HA σημασμένων πρωτεϊνών από κύτταρα που έχουν διαμολυνθεί με τις πλασμιδιακές κατασκευές pcDNA 3.1-HA-AP2α wt και pcDNA 3.1-HA-AP2α mut.....	55
5.4.2	Ανοσοκατακρήμνιση HA σημασμένων πρωτεϊνών από κύτταρα που έχουν συνδιαμολυνθεί με τις πλασμιδιακές κατασκευές pcDNA 3.1-HA-AP2α wt, pcDNA 3.1-HA-AP2α mut και pcDNA3.1-His-SUMO2.....	58
6	ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	61
7	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	66

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιοχημείας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών “Κλινικές εφαρμογές της Μοριακής Ιατρικής”, υπό την επίβλεψη της Λέκτορος Κυτταρικής Βιοχημείας, κας Χαχάμη Γεωργίας. Νιώθω την ανάγκη να την ευχαριστήσω για τη μεγάλη υπομονή της, την αμέριστη βοήθεια και στήριξή της καθόλη τη διάρκεια της διπλωματικής εργασίας, την άριστη συνεργασία που είχαμε, αλλά κυρίως για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε από την πρώτη στιγμή. Με τις πολύτιμες συμβουλές και καθοδηγήσεις της είχα την ευκαιρία να γνωρίσω σε βάθος το ενδιαφέρον πεδίο της Βιοχημείας και την εργασία σε ένα Ερευνητικό Εργαστήριο καθώς και να αποκομίσω πρακτικές και θεωρητικές γνώσεις υψηλού επιπέδου.

Ευχαριστώ τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής: κ. Γερμενή Αναστάσιο, Καθηγητή Εργαστηριακής Ανοσολογίας και υπεύθυνο του Π.Μ.Σ, και τον κ. Μυλωνή Ηλία, Επίκουρο Καθηγητή Βιοχημείας για τη συμβολή τους στην ολοκλήρωση της εργασίας μου, και τις πολύτιμες συμβουλές και υποδείξεις τους.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη Δ.Ε.Π του εργαστηρίου Βιοχημείας για τις συμβουλές τους και τις ενδιαφέρουσες διαλέξεις τους, από τις οποίες αποκόμισα πολύτιμες γνώσεις που με βοήθησαν στην κατανόηση της επιστήμης της Βιοχημείας.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου: Μπεφάνη Χριστίνα, Κούρτη Μαρία, Πάγγου Έυα, Δρακούλη Σωτηρία, Γκοτινάκου Ιωάννα και Καραγιώτα Αγγελική για τη βοήθεια και τις υποδείξεις τους στις απορίες και δυσκολίες που είχα στο χώρο του εργαστηρίου, μα πάνω απ'όλα τις ευχαριστώ για την παρέα και το ευχάριστο φιλικό κλίμα που δημιούργησαν.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ως υποξία ορίζεται η κατάσταση χαμηλής συγκέντρωσης οξυγόνου και μπορεί να συμβεί σε φυσιολογικές αλλά και σε παθολογικές καταστάσεις. Έχει παρατηρηθεί ότι σε στρεσογόνες καταστάσεις, οι πρωτεΐνες αλλάζουν μαζικά τη σουμοϋλίωσή τους. Σουμοϋλίωση είναι μια μετα-μεταφραστική τροποποίηση η οποία παίζει σημαντικό ρόλο σε πολλές κυτταρικές λειτουργίες. Προκειμένου να ταυτοποιηθούν οι πρωτεΐνες των οποίων η σουμοϋλίωση αλλάζει μετά απο έκθεση σε υποξία, έγινε ένα πείραμα ποσοτικής πρωτεομικής ανάλυσης ενδογενών σουμοϋλιωμένων πρωτεϊνών σε συνθήκες υποξίας (Χαχάμη Γεωργία). Βρέθηκε ότι πολλές πρωτεΐνες μεταβάλλουν την σουμοϋλίωσή τους στην υποξία, χωρίς όμως να μεταβάλλουν τα επίπεδα έκφρασης τους. Ανάμεσα τους είναι και ο μεταγραφικός παράγοντας TFAP2α (Transcriptional Factor Activator Protein 2-alpha). Η μελέτη του TFAP2α παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον καθώς φαίνεται να εμπλέκεται σε πολλούς τύπους και στάδια καρκινογένεσης, ενώ έχει βρεθεί ότι αλληλεπιδρά και με παράγοντες του μονοπατιού της υποξίας.

Η παρούσα εργασία είναι μέρος της μελέτης της σουμοϋλίωσης του TFAP2α και του γενικότερου ρόλου της για την κυτταρική απόκριση στην υποξία. Αρχικά ο TFAP2α, καθώς και η μεταλλαγμένη μορφή του, που φέρει μετάλλαξη στη Lys10 (K10R) και πιθανά έχει χάσει την ικανότητα σουμοϋλίωσης, κλωνοποιήθηκαν σε πλασμιδιακό φορέα που φέρει τον επίτοπο HA. Οι δυο ανασυνδυασμένες μορφές του HA-AP2α εκφράστηκαν ενδοπυρηνικά σε κύτταρα HeLa σε παρόμοια επίπεδα. Επιπλέον τα επίπεδα έκφρασης τους δεν φάνηκε να μεταβάλλονται στην υποξία. Οι υπερεκφρασμένες πρωτεΐνες χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα ανοσοκατακρήμνισης προκειμένου να ανιχνευθεί η σουμοϋλίωση του υπερεκφρασμένου HA-AP2α σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας. Τα αποτελέσματα έδειξαν την σουμοϋλίωση του TFAP2α απο τη SUMO2 πρωτεΐνη στη θέση Lys10. Επιπλέον βρέθηκε ότι η σουμοϋλίωση του υπερεκφρασμένου TFAP2α μειώνεται μετά απο 24 και 48 ώρες έκθεσης σε υποξία. Τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώνουν τα ευρήματα του προκαταρκτικού ελέγχου που αφορούν στη σουμοϋλίωση του ενδογενούς TFAP2α σε συνθήκες υποξίας και θα βοηθήσουν στην περαιτέρω κατανόηση των μηχανισμών ρύθμισης του TFAP2α κατά την κυτταρική απόκριση στην υποξία.

ABSTRACT

Hypoxia is defined as the condition of low oxygen concentration and may occur in both normal and pathological situations. It has been observed that stress conditions cause global changes in the sumoylation of proteins. Sumoylation is a post-translational modification that plays important role in many cellular functions. In order to identify proteins which change their sumoylation after exposure to hypoxia, a quantitative proteomic analysis of endogenous sumoylated proteins was performed under normoxic and hypoxic conditions (Chachami Georgia). It was found that among the proteins that alter their sumoylation in hypoxia, without changing their expression levels is the transcriptional factor TFAP2 α (Transcriptional Factor Activator Protein 2-alpha). The study of TFAP2 α is of a great interest since it appears to be implicated in cancer progression, and also it has been found to interact with proteins of the hypoxic pathway.

This work is part of the study of TFAP2 α sumoylation and its general role in cellular adaptation during hypoxia. TFAP2 α as well its SUMO-deficient mutant at Lys10 (K10R) were cloned into a plasmid vector introducing an HA epitope. The two forms of recombinant HA-AP2 α were expressed in the nucleus in HeLa cells at similar levels, furthermore expression levels did not appear to change in hypoxia. The overexpressed proteins were also used in immunoprecipitation assays in order to detect their sumoylation in both normoxic and hypoxic conditions. The results confirmed the sumoylation of TFAP2 α from SUMO2 protein at Lys10. Finally, it was found that the sumoylation of overexpressed TFAP2 α is reduced after 24 and 48 hours of exposure to hypoxia. These results confirm the findings of preliminary experiments concerning reduction of sumoylation of endogenous TFAP2 α upon hypoxia and will help to further understand the mechanisms underlying TFAP2 α regulation in the cellular response to hypoxia.

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΥΠΟΞΙΑ

1.1.1 Ομοιοστασία κυττάρων σε χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου (υποξία)

Η ικανότητα ενός οργανισμού ή κυττάρου να ρυθμίζει τις εσωτερικές του συνθήκες ώστε να διασφαλίσει τη σταθερότητα και τη λειτουργικότητα του, παρά τις μεταβολές του περιβάλλοντος ονομάζεται ομοιοστασία. Ένα κύτταρο ανταποκρίνεται έντονα σε συγκεκριμένα ερεθίσματα του περιβάλλοντος, ένα από αυτά είναι και η μεταβολή της συγκέντρωσης του οξυγόνου. Η συγκέντρωση του οξυγόνου μέσα στον οργανισμό πρέπει να βρίσκεται σε ομοιοστασία γιατί η αλλαγή της έχει αρνητικές συνέπειες για την επιβίωση των κυττάρων. Η αυξημένη συγκέντρωση οξυγόνου (υπεροξία) οδηγεί σε αύξηση των δραστικών μορφών του (Reactive Oxygen Species, ROS) που μπορεί να είναι καταστροφικές για τα κύτταρα. Η μειωμένη διαθεσιμότητα O₂, που ορίζεται ως **υποξία**, αποτελεί ένα ερέθισμα για τον οργανισμό και μπορεί να συμβεί στη φυσιολογική διαδικασία ανάπτυξης των ιστών (εμβρυογένεση, οστεογένεση), σε καταστάσεις έντονης μυικής άσκησης ή παραμονής σε υψηλό υψόμετρο. Ωστόσο μπορεί να συμβεί και σε παθολογικές καταστάσεις όπως στην αναιμία, στην ισχαιμία, στη φλεγμονή και τον καρκίνο. Τα κύτταρα ενός ιστού ανταποκρίνονται άμεσα στο υποξικό περιβάλλον προκειμένου να επιβιώσουν στις νέες συνθήκες. Σε μια γρήγορη απόκριση πρωτεΐνες τροποποιούνται μετα-μεταφραστικά, ενώ ακολουθεί μια πιο καθυστερημένη απόκριση κατά την οποία τα κύτταρα ενεργοποιούν μια πληθώρα γονιδίων που εμπλέκονται σε διαδικασίες που από τη μία έχουν ως στόχο την αύξηση της παροχής του οξυγόνου στους ιστούς όπως είναι η ερυθροποίηση και η αγγειογένεση, και από την άλλη έχουν ως στόχο την παραγωγή ενέργειας μέσω αναερόβιου μεταβολισμού (1). Τέλος, η υποξία αποτελεί γνώρισμα των συμπαγών όγκων, όπου παρατηρείται επαγωγή γονιδίων που σχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό, την απόπτωση, και την ικανότητα διήθησης και μετάστασης. Οι κύριοι διαμεσολαβητές της απόκρισης των κυττάρων στην υποξία είναι οι μεταγραφικοί παράγοντες HIFs (Επαγόμενοι από την υποξία παράγοντες -Hypoxia Inducible Factors) των οποίων η μελέτη και η κατανόηση των μηχανισμών ρύθμισής τους, παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον (2).

1.1.2 Γονίδια στόχοι της υποξίας

Έχοντας ως στόχο την διατήρηση της ομοιοστασίας οξυγόνου, και την ισορροπία των οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων, η ανταπόκριση του οργανισμού στο ερέθισμα της υποξίας περιλαμβάνει την ενεργοποίηση γονιδίων που σχετίζονται με την αύξηση μεταφοράς του οξυγόνου στην υποξική περιοχή. Για παράδειγμα, έχουμε επαγωγή του αυξητικού παράγοντα του αγγειακού

ενδοθηλίου (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) και του iNOS (inducible Nitric Oxide Synthase) που προκαλεί αγγειοδιαστολή. Επιπλέον, η υποξία ρυθμίζει ανοδικά του μονοπατιού, την έκφραση της ερυθροποιητίνης (EPO), η οποία απαιτείται για την παραγωγή ερυθρών αιμοσφαιρίων. Η δημιουργία νέων ερυθροκυττάρων αυξάνει την παροχή του οξυγόνου στους ιστούς, ώστε να επιτευχθεί η ομοιοστασία οξυγόνου. Επιπλέον, ενεργοποιούνται γονίδια που σχετίζονται με την παραγωγή ενέργειας μέσω της γλυκολυτικής οδού δεδομένου ότι στην υποξία δεν μπορεί να υπάρξει αερόβιος μεταβολισμός. Σε υποξικές συνθήκες τα κύτταρα παράγουν μόνο 2 μόρια ATP από την μη οξυγονοεξαρτώμενη γλυκόλυση σε αντίθεση με τα 30-32 μόρια ATP που παράγονται από τον οξυγονοεξαρτώμενο κύκλο του τρικαρβοξυλικού οξέος. Για να ανταπεξέλθουν στις ενεργειακές τους ανάγκες τα κύτταρα αυξάνουν την ικανότητα να παράγουν ATP, μέσω αύξησης της πρόσληψης γλυκόζης και μέσω επαγωγής των ενζύμων μεταφοράς γλυκόζης (GLUT1, GLUT3), και των ενζύμων της γλυκολυτικής οδού (εξοκινάση, φωσφοφρουκτοκινάση, αλδολάση κ.α.).

Τέλος, η υποξία ελέγχει γονίδια που είναι χαρακτηριστικά της πορείας της καρκινογένεσης. Κάποια από αυτά είναι απαραίτητα για τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των κυττάρων όπως είναι ο TGF α (Transforming Growth Factor) σε κύτταρα ρινικού καρκινώματος, ο αυξητικός παράγοντας Ινσουλίνης IGF2 (Insulin Growth Factor), η ενδοθηλίνη 1 EDN1 (endothelin) σε καρκινικά κύτταρα μαστού και παγκρέατος, (3, 4). Άλλα γονίδια που επάγονται από την υποξία εμπλέκονται στη διαδικασία μετάβασης από επιθηλιακά σε μεσεγχυματικά κύτταρα (Epithelial-Mesenchymal Transition, EMT), όπως για παράδειγμα τα γονίδια ID2, SNAI1, SNAI2, TCF3 που καταστέλουν τη δράση της E-καντχερίνης (E-cadherin, υπεύθυνη για την προσκόλληση μεταξύ των κυττάρων) (5). Καθώς και γονίδια που είναι υπεύθυνα για την διήθηση και τη μετάσταση του όγκου (6)

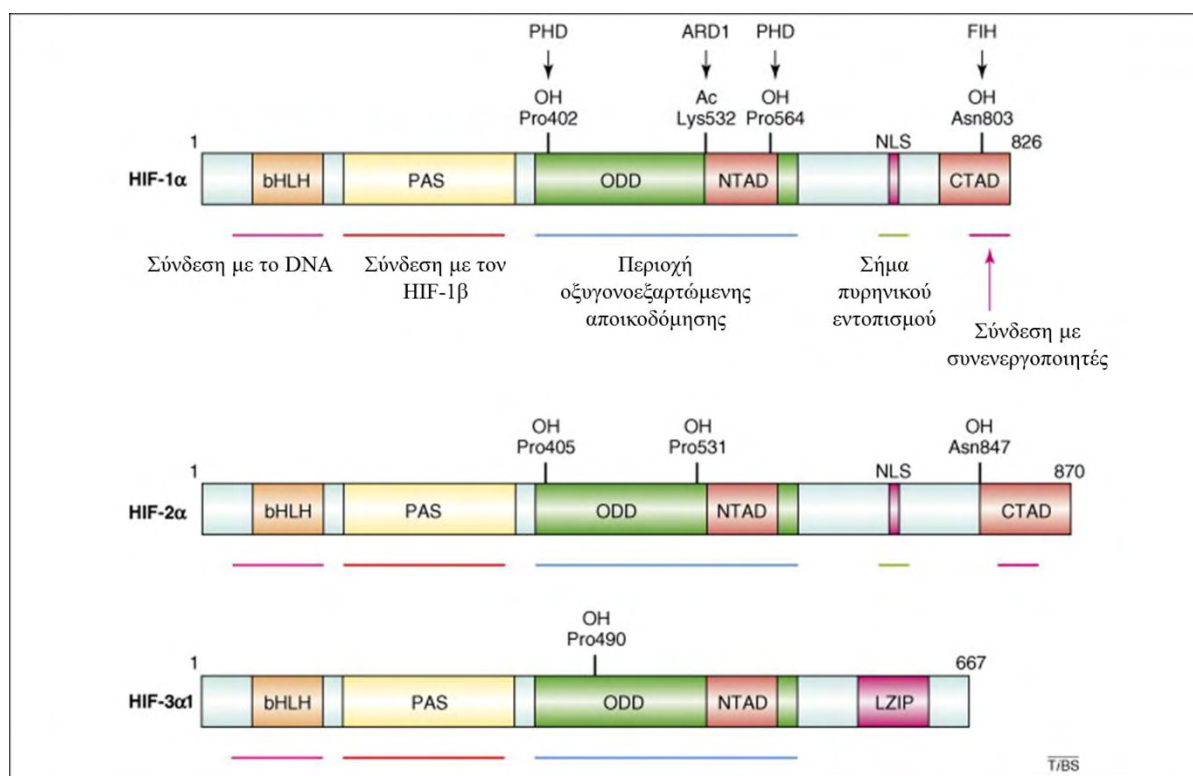
1.1.3 Η οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων HIF

Οι μεταγραφικοί παράγοντες HIF είναι οι κύριοι διαμεσολαβητές της απόκρισης των κυττάρων σε συνθήκες έλλειψης οξυγόνου. Η οικογένεια αυτή (PER-ARNT-SIM οικογένεια) αποτελείται από τους **HIF-1 α** , **HIF-2 α** , **HIF-3 α** και **HIF-1 β** ή **ARNT** (Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator).

Ο HIF-1 είναι ένας ετεροδιμερής μεταγραφικός παράγοντας και αποτελείται από τη συνεχώς εκφραζόμενη β υπομονάδα (HIF-1 β) και την α υπομονάδα που υπόκειται συνεχώς σε αποικοδόμηση κατά τη νορμοξία (κατάσταση φυσιολογικής οξυγόνωσης, 21% O₂), ενώ σταθεροποιείται κατά την υποξία. Έχουν ταυτοποιηθεί τρεις ισομορφές για την α υπομονάδα (HIF-1 α , 2 α και 3 α *Εικόνα 1*). Όλες οι υπομονάδες χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη του μοτίβου έλικα-θηλιά-έλικα, (basic Helix-Loop-Helix, **bHLH**) που είναι υπεύθυνο για την σύνδεση στο DNA, την

περιοχή ετεροδιμερισμού PER-ARNT-SIM (**PAS**) και την οξυγονοεξαρτώμενη περιοχή (Oxygen-Dependent Degradation, **ODD**). Στο καρβοξυτελικό τους άκρο, οι HIF-1α και HIF-2α φέρουν δύο περιοχές ενεργοποίησης της μεταγραφής - TADs (Transactivation Domains), N-TAD και C-TAD, οι οποίες απαιτούνται για την επαγωγή των γονιδίων στόχων τους. Η είσοδος του HIF-1α στον πυρήνα πραγματοποιείται μέσω αναγνώρισης ειδικών αλληλουχιών που ονομάζονται σήματα πυρηνικού εντοπισμού (Nuclear Localization Signals - NLS *Εικόνα 1*).

Τόσο ο HIF-1α όσο και ο HIF-2α έχουν σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες ως μεταγραφικοί παράγοντες με κάποιες διαφορές ως προς τα γονίδια στόχους. Ο HIF-2α παρουσιάζει 48% ομολογία στην αμινοξική αλληλουχία με τον HIF-1α, ωστόσο η κατανομή του περιορίζεται σε ορισμένους τύπους κυττάρων και ιστών. Ο HIF-1α εκφράζεται σχεδόν σε όλα τα κύτταρα, ενώ η έκφραση του HIF-2α περιορίζεται σε ορισμένους κυτταρικούς τύπους, όπως κύτταρα ενδοθηλίου, γλοίας, νεφρών, ινοβλάστες, ηπατοκύτταρα. Ο HIF-3α είναι η ισομορφή που ανακαλύφθηκε πιο πρόσφατα και φαίνεται να λειτουργεί σαν αρνητικός ρυθμιστής για τον HIF-1α και HIF-2α, δεδομένου ότι του λείπει το καρβοξυτελικό άκρο που απαιτείται για τη μεταγραφική του ενεργότητα. (7)

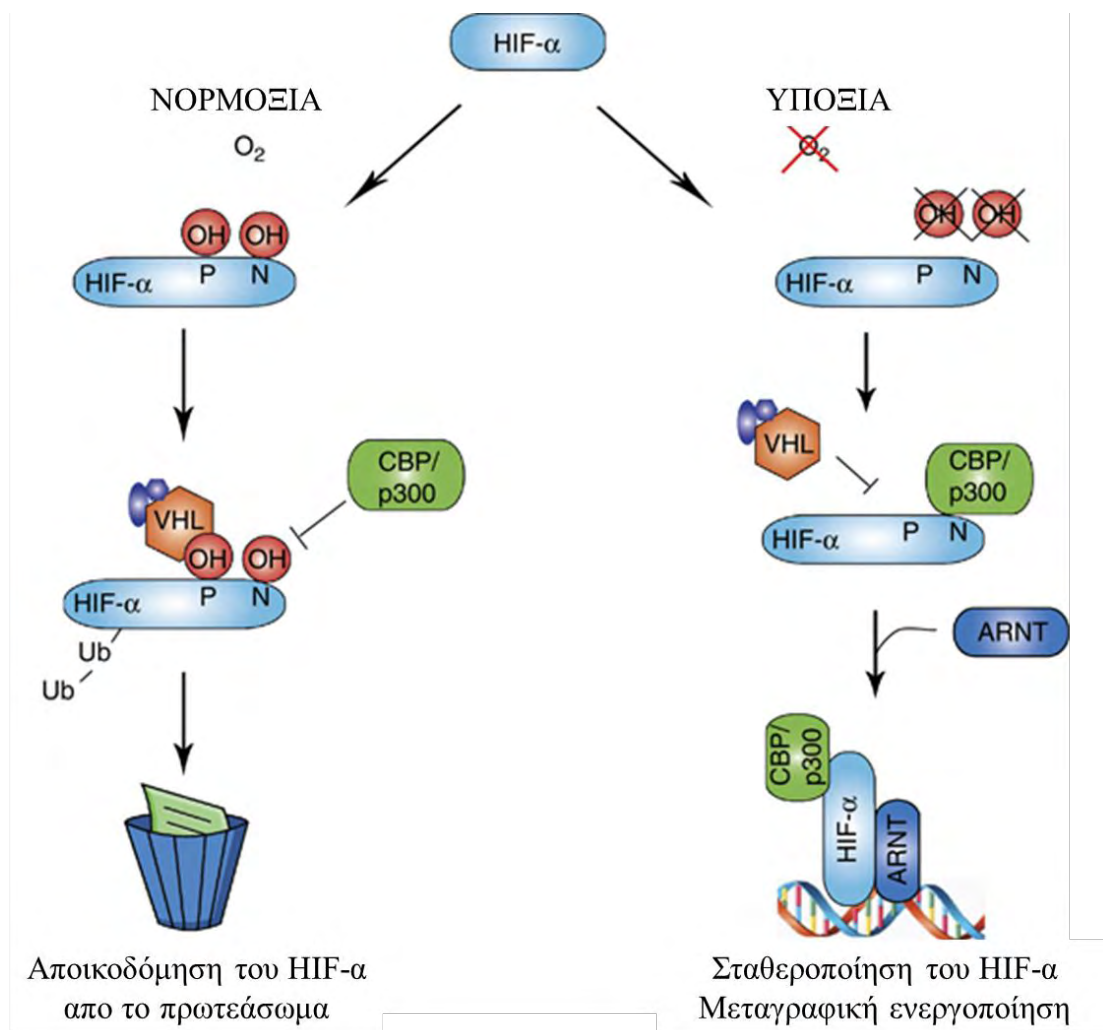


Εικόνα 1 : Οι δομικές επικράτειες των μελών της οικογένειας των HIF (8)

1.1.4 Ρύθμιση του επαγόμενου από την υποξία παράγοντα HIF

1.1.4.1 Οξυγονοεξαρτώμενη ρύθμιση των HIF-α

Σε καταστάσεις φυσιολογικής συγκέντρωσης οξυγόνου, ο HIF-1α υδροξυλιώνεται στην ODD περιοχή του στα κατάλοιπα προλίνης Pro 402 και 564, ενώ ο HIF-2α υδροξυλιώνεται στα κατάλοιπα προλίνης Pro 405 και 531. Αυτή η υδροξυλίωση καταλύεται από μια τάξη ενζύμων που ονομάζονται προλιν-υδροξυλάσες (prolyl-hydroxylases, **PHDs**). Όλες οι PHDs χρειάζονται δισθενή σίδηρο Fe^{2+} και α-κετογλουταρικό σαν συμπαραγόντες για την ενζυμική τους δράση καθώς και μοριακό οξυγόνο ως υπόστρωμα. Η πρόλιν-υδροξυλίωση των HIF-α προσελκύει την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη von Hippel-Lindau (**VHL**), η οποία αναγνωρίζεται από την E3-λιγάση-ουβικιτίνης με αποτέλεσμα την πολυ-ουβικιτινίωση στη Λυσίνη Lys 48 και πρωτεοσωμική αποικοδόμηση των HIF-α. Στην υποξία οι PHDs παραμένουν ανενεργές, αφού η συγκέντρωση οξυγόνου είναι ο περιοριστικός παράγοντας (Εικόνα 2). Περαιτέρω συντονισμός της κυτταρικής απόκρισης στην υποξία γίνεται με την υδροξυλίωση στην καρβοξυ-τελική περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης (C-TAD) του HIF-1α και 2α από τον ανασταλτικό παράγοντα του HIF (Factor Inhibiting HIF-1, **FIH**). Πρόκειται για μια υδροξυλάση ασπαραγίνης που μπορεί να υδροξυλιώσει τον HIF-1α στην ασπαραγίνη Asn 803 και τον HIF-2α στην Asn 847 εμποδίζοντας έτσι την σύνδεση των μεταγραφικών συνενεργοποιητών p300/CBP και κατά συνέπεια την πλήρη ενεργοποίηση των γονιδίων στόχων (9). Όπως και οι PHDs, απαιτείται Fe^{2+} και α-κετογλουταρικό σαν συμπαραγόντες και μοριακό οξυγόνο σαν συν-υπόστρωμα για να λειτουργήσει, αλλά έχει μειωμένη συγγένεια στο μοριακό οξυγόνο σε σύγκριση με τις PHDs (3). Υπό χαμηλή συγκέντρωση οξυγόνου ο HIF σταθεροποιείται, εισέρχεται στον πυρήνα όπου μπορεί να ετεροδιμεριστεί με τον HIF-1β και να συνδεθεί σε cis ρυθμιστικά στοιχεία απόκρισης στην υποξία (Hypoxia Response Elements, **HRE**) με αλληλουχία 5'-(A/G)CGTG-3', η οποία βρίσκεται στους ενισχυτές ή στους εκκινητές των γονιδίων-στόχων του HIF (5). Επομένως η σταθεροποίηση του HIF-1α επιτρέπει στο κύτταρο να ξεκινήσει ένα πρόγραμμα ενεργοποίησης της μεταγραφής γονιδίων που ως στόχο έχουν την επιβίωση του κυττάρου σε υποξικό περιβάλλον.

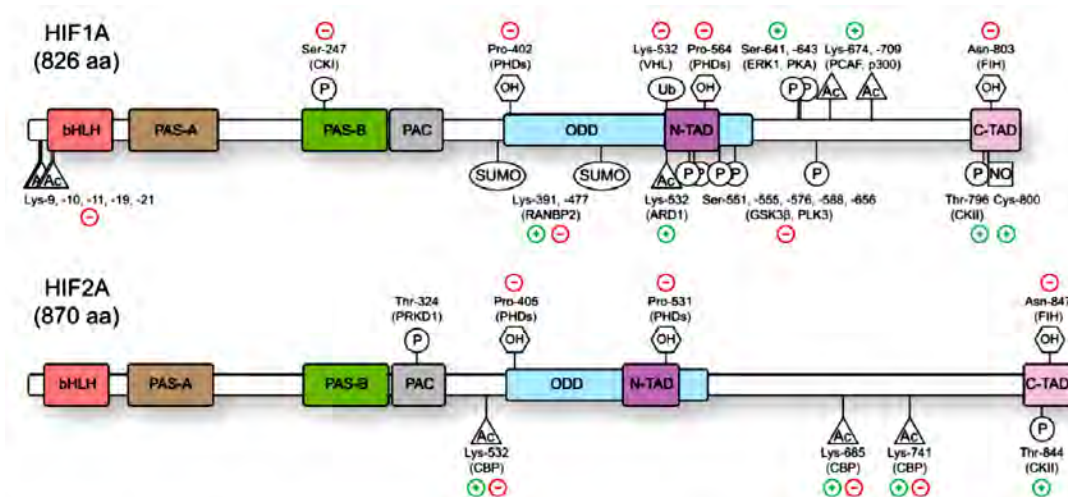


Εικόνα 2: Οξυγονοεξαρτώμενη ρύθμιση του HIF-1α.. Σε νορμοξία, η HIF-1α υπομονάδα υδροξυλιώνεται γρήγορα από τις PHDs και προσδένεται στον παράγοντα von Hippel-Lindau (vHL), με αποτέλεσμα την γρήγορη ουβικιτινίωση και την αποικοδόμησή του στο πρωτεάσωμα. Σε υποξία, ο HIF-1α σταθεροποιείται και μεταφέρεται στον πυρήνα όπου διμερίζεται με τον HIF-1β. Το HIF-1 ετεροδιμερές επάγει την μεταγραφή των γονιδίων στόχων, μετά από πρόσδεσή του στα HRE του υποκινητή, και σε συνεργασία με τον συνενεργοποιητή p300/CBP (10).

1.1.4.2 Μη οξυγονοεξαρτώμενη ρύθμιση των HIF-α

Εκτός από το οξυγονοεξαρτώμενο μονοπάτι που περιγράφηκε προηγουμένως, υπάρχει και μη οξυγονοεξαρτώμενος τρόπος ρύθμισης της σύνθεσης και της αποικοδόμησης του HIF-α. Η επαγωγή του HIF-1α μπορεί να γίνει μετά από επίδραση αυξητικών παραγόντων, κυτοκινών και άλλων μορίων που ενεργοποιούν τα μονοπάτια της κινάσης της τριφωσφορικής ινοσιτόλης (PI3K) και το μονοπάτι των πρωτεϊνικών κινασών που ενεργοποιούνται από μιτογόνα (Mitogen-activated Protein Kinases, MAPK) (1).

Επιπλέον η ανάγκη για γρήγορη απόκριση σε εξωτερικά ερεθίσματα, έχει σαν αποτέλεσμα τον έλεγχο του HIF από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, οι οποίες μπορούν με γρήγορο και αντιστρεπτό τρόπο να σταθεροποιήσουν τον HIF, να τον οδηγήσουν προς αποικοδόμηση ή να του δώσουν νέες ιδιότητες (Εικόνα 3). Βασική μετα-μεταφραστική τροποποίηση των HIF αποτελεί η **φωσφορυλίωση**. Έχει δειχθεί ότι η φωσφορυλίωση των υπομονάδων HIF-1α και HIF-2α επάγει την μεταγραφική ενεργότητα των γονιδίων στόχων, είτε λόγω αύξησης των επιπέδων τους στο κύτταρο, είτε γιατί εμποδίζουν την αποικοδόμησή του (11, 12). Ενώ υπάρχουν φωσφορυλιώσεις που προκαλούν μείωση της ενεργότητας ή της σταθερότητας του HIF. Για παράδειγμα η κινάση καζεΐνης (casein kinase 1, CKI) φωσφορυλιώνει τον HIF-1α στην PAS περιοχή και εμποδίζει την αλληλεπίδρασή του με τον ARNT, μειώνοντας έτσι τη μεταγραφική του ενεργότητα (13). Επιπλέον, τροποποιήσεις όπως η ακετυλίωση και η νιτροζυλίωση μπορεί να έχουν ενεργοποιητικό ή ανασταλτικό ρόλο στη δράση του HIF, αναλόγως με τη θέση τροποποίησης (14). Τέλος, έχει βρεθεί ότι ο HIF σουμοϋλιώνεται, ωστόσο ο ρόλος αυτής της τροποποίησης δεν είναι ξεκάθαρος. Θα αναπτυχθεί παρακάτω εκτενέστερα ο ρόλος της σουμοϋλίωσης στο μονοπάτι της υποξίας.



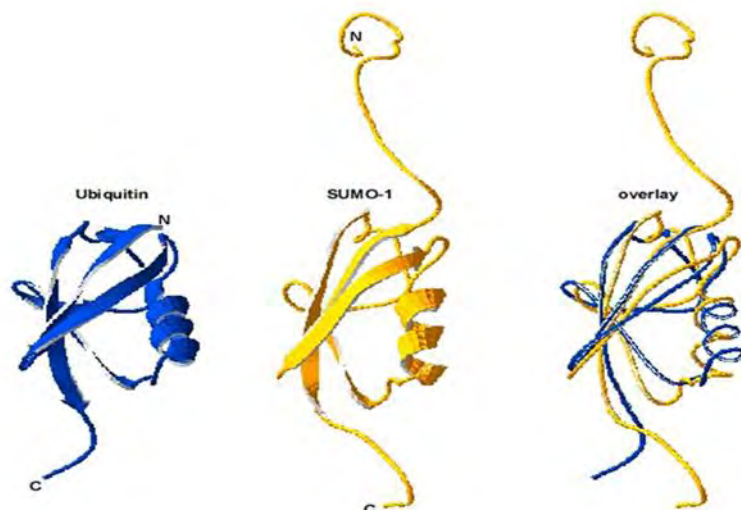
Εικόνα 3: Οι μεταγραφικοί παράγοντες HIF1α και HIF2α, και οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις τους. Με πράσινο (+) φαίνονται οι τροποποιήσεις που επιδρούν θετικά στην μεταγραφική ενεργότητα, ενώ με κόκκινο (-) είναι οι τροποποιήσεις με αρνητική δράση (14).

1.2 ΣΟΥΜΟΪΛΙΩΣΗ

1.2.1 Γενικά χαρακτηριστικά της σουμοϋλίωσης

Οι αντιστρεπτές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις πρωτεϊνών αποτελούν έναν γρήγορο και αποτελεσματικό τρόπο για να αποκριθεί το κύτταρο σε ενδοκυτταρικά και εξωκυτταρικά ερεθίσματα, και γι' αυτό παίζουν σημαντικό ρόλο σε μονοπάτια κυτταρικής σηματοδότησης. Μια προσφάτως ταυτοποιημένη αντιστρεπτή τροποποίηση είναι η ομοιοπολική προσθήκη της πρωτεΐνης

SUMO (Small Ubiquitin-related Modifier) πάνω σε άλλες πρωτεΐνες, διαδικασία γνωστή και ως **σουμοϋλίωση**. Η σουμοϋλίωση διαφέρει από τις υπόλοιπες τροποποιήσεις, όπως τη φωσφορυλίωση, κατα την οποία υπάρχει προσθήκη μιας μικρής χημικής ομάδας αλλά μοιάζει με μια άλλη κοινή τροποποίηση πρωτεϊνών την ουβικιτινίωση. Η SUMO είναι μια μικρή σφαιρική πρωτεΐνη (10-11 kDa, 97 αμινοξέα) που μοιάζει με την ουβικιτίνη στη τρισδιάστατη διαμόρφωση της (*Εικόνα 4*), και προσδένεται στις πρωτεΐνες στόχους με τον ίδιο μηχανισμό, με τη διαφορά ότι συμμετέχουν διαφορετικά ένζυμα (15)



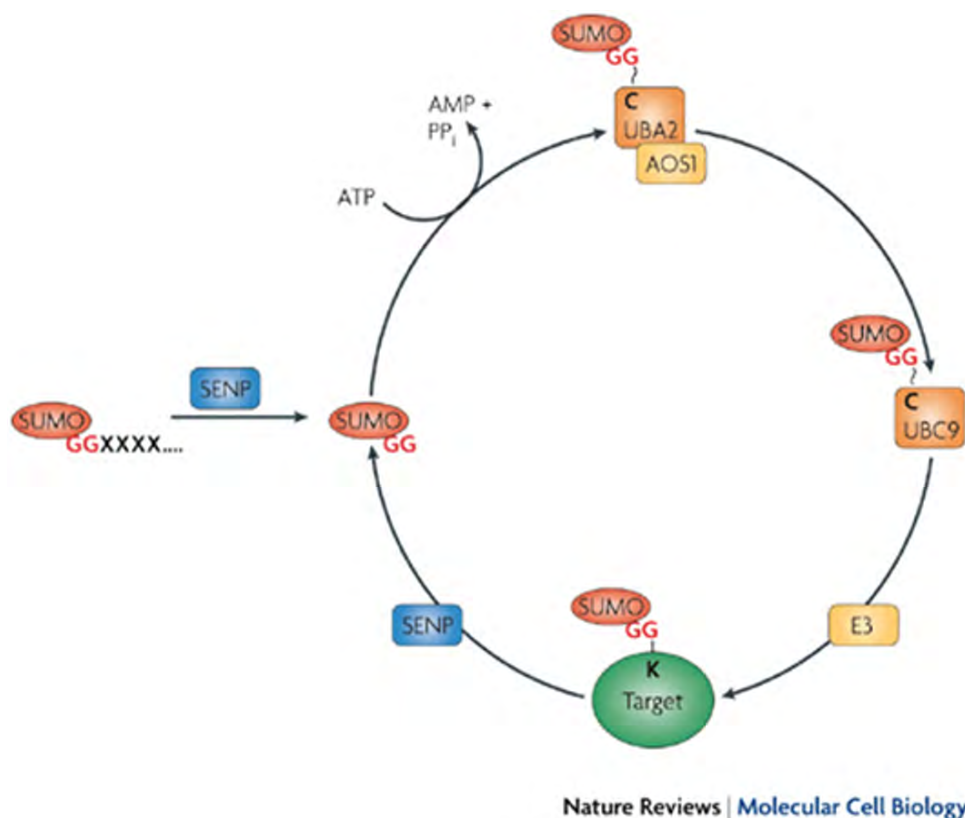
Εικόνα 4: Σχηματική απεικόνιση της ουβικιτίνης και της πρωτεΐνης SUMO1. Φαίνεται η δομική τους ομοιότητα, και η διαφορά τους ως προς το αμινοτελικό τους άκρο (16).

Στα θηλαστικά υπάρχουν 4 πρωτεΐνες SUMO: SUMO-1/Smt3C, SUMO-2/Smt3A, SUMO-3/Smt3B, και SUMO-4. Οι SUMO2 και SUMO3 είναι εξαιρετικά όμοιες, παρουσιάζουν 97% ομοιότητα μεταξύ τους, και γι' αυτό αναφέρονται και ως SUMO2/3, η SUMO1 διαφέρει σημαντικά (47% ομοιότητα μεταξύ της ανθρώπινης SUMO1 και της SUMO2/3) (16). Διάφορες πρωτεΐνες τροποποιούνται και από τα τρία πρώτα είδη SUMO σε πειράματα *in vivo* και *in vitro*, αλλά στις κυτταρικές διαδικασίες ενδεχομένως να υπάρχει ειδικότητα. Αυτό φαίνεται και από το γεγονός ότι στα κύτταρα των θηλαστικών το μεγαλύτερο ποσοστό της SUMO1 βρίσκεται προσδεδεμένο σε πρωτεΐνες στόχους, ενώ οι SUMO2/3 είναι ελεύθερες. Οι SUMO2/3 είναι πιθανό να σχηματίζουν αλυσίδες όταν προσδένονται στις πρωτεΐνες στόχους. Η SUMO4 ανακαλύφθηκε τελευταία και φαίνεται να έχει περιορισμένα επίπεδα έκφρασης. Η σουμοϋλίωση εμπλέκεται σε ένα πλήθος κυτταρικών διαδικασιών όπως η μεταγραφή, η πυρηνική μεταφορά, η επιδιόρθωση του DNA, ο κυτταρικός κύκλος και η αναδιάρθρωση της χρωματίνης. Ανά πάσα στιγμή, ένα πολύ μικρό ποσοστό πρωτεϊνών είναι σουμοϋλιωμένο, συνήθως γύρω στο 1%, (17) γι' αυτό συχνά είναι ιδιαίτερα δύσκολη η ανίχνευση των σουμοϋλιωμένων μορφών των πρωτεϊνών.

1.2.2 Μηχανισμός σουμοϋλίωσης

Η προσθήκη της SUMO γίνεται σε λυσίνες στόχους των πρωτεϊνών που εντοπίζονται συνήθως σε μια συντηρημένη περιοχή Ψ-K-X-E (Ψ: υδρόφοβο αμινοξύ, X: οποιοδήποτε αμινοξύ). Η SUMO «ωριμάζει» μετά από πρωτεόλυση του καρβοξυτελικού κομματιού της από την ειδική πρωτεάση (SUMO Protease, SENP) αποκαλύπτοντας ένα μοτίβο Γλυκίνης-Γλυκίνης στο καρβοξυτελικό άκρο και στη συνέχεια ενεργοποιείται προσδεδεμένο στο ετεροδιμερές ένζυμο **E1 SAE1(Aos1)/SAE2(Uba2)** σχηματίζοντας έναν θειοεστερικό δεσμό. Η ενεργοποιημένη SUMO μεταφέρεται στο ένζυμο **E2** ή αλλιώς **Ubc9**, και στη συνέχεια στη συγκεκριμένη λυσίνη της πρωτεΐνης στόχου. Η μεταφορά από το ένζυμο E2 στη λυσίνη στόχο καταλύεται συχνά με τη βοήθεια των ένζυμων E3 που έχουν δράση λιγάσης και προσφέρουν εξειδίκευση στις *in vivo* διαδικασίες. Ωστόσο δεν είναι πάντα απαραίτητη η παρουσία κάποιας E3 λιγάσης για να γίνει η ομοιοπολική σύνδεση. Ουσιαστικά η E3 λιγάση προσανατολίζει κατάλληλα τον θειοεστερικό δεσμό μεταξύ Ubc9 και SUMO στην εκάστοτε πρωτεΐνη-υπόστρωμα, ώστε να επιτραπεί η πυρηνόφιλη προσβολή από την αμινομάδα της λυσίνης του υποστρώματος. Έχουν ταυτοποιηθεί αρκετά ένζυμα με δράση E3 λιγάσης, ανάμεσα σε αυτά είναι πρωτεΐνες που ανήκουν στην οικογένεια των **Siz/PIAS** (Protein Inhibitor of Activated STAT), η RanBP2, καθώς και η ανθρώπινη πρωτεΐνη **Pc2**, μέλος του συμπλόκου Polycomb Group (PcG) (18)

Η προσθήκη SUMO είναι μια δυναμική, αντιστρεπτή διαδικασία και η απομάκρυνση της γίνεται με τη δράση ειδικών ισοπεπτιδασών (που ανήκουν στην κατηγορία πεπτιδασών κυστεΐνης), των ίδιων που είναι υπεύθυνες για την ωρίμανσή του. Στα θηλαστικά έχουν βρεθεί 6 είδη SUMO πρωτεασών, οι **SENP-1,-2,-3,-5,-6** και **-7** (Sentrin specific Proteases). Η συχνότητα της αποσουμοϋλίωσης από τις SENPs είναι μεγάλης σημασίας για την σταθερότητα και τη λειτουργικότητα του κυττάρου. Έχει βρεθεί σε διάφορους τύπους καρκινώματος, αλλαγή στα επίπεδα έκφρασης των SENPs, με αποτέλεσμα την διατάραξη της ισορροπίας μεταξύ σουμοϋλιωμένων και αποσουμοϋλιωμένων πρωτεϊνών (19). Οι πρωτεάσες που είναι γνωστές μέχρι σήμερα, παρουσιάζουν η κάθε μία διαφορετικό πρότυπο εντοπισμού μέσα στον πυρήνα (15). Ο διαφορετικός εντοπισμός ενδεχομένως να είναι αυτός που προσδίδει και την εξειδίκευση για το σουμοϋλιωμένο υπόστρωμα που δρουν.



Εικόνα 5: Ο κύκλος της σουμοϋλίωσης/αποσουμοϋλίωσης. Αρχικά γίνεται πρωτεολυτική ωρίμανση μιας SUMO πρωτεΐνης και αποκάλυψη του C-τελικού άκρου GG από ειδικές πρωτεάσες SENPs. Σε αυτή τη διαδικασία το E1 ένζυμο δημιουργεί θειοεστερικό δεσμό με το καρβοξυτελικό άκρο της SUMO καταναλώνοντας ένα μόριο ATP. Στη συνέχεια ο θειοεστερικός δεσμός του SUMO μεταφέρεται στο E2 συζευκτικό ένζυμο που ονομάζεται Ubc9. Η Ubc9 με την καταλυτική βοήθεια της E3 λιγάσης δημιουργεί ισοπεπτιδικό δεσμό μεταξύ της καρβοξυτελικής γλυκίνης του SUMO και της λυσίνης δέκτη της πρωτεΐνης στόχου. Η SUMO πρωτεάση SENP, κόβει τον ισοπεπτιδικό δεσμό και απελευθερώνει το SUMO για έναν νέο κύκλο σουμοϋλίωσης (15).

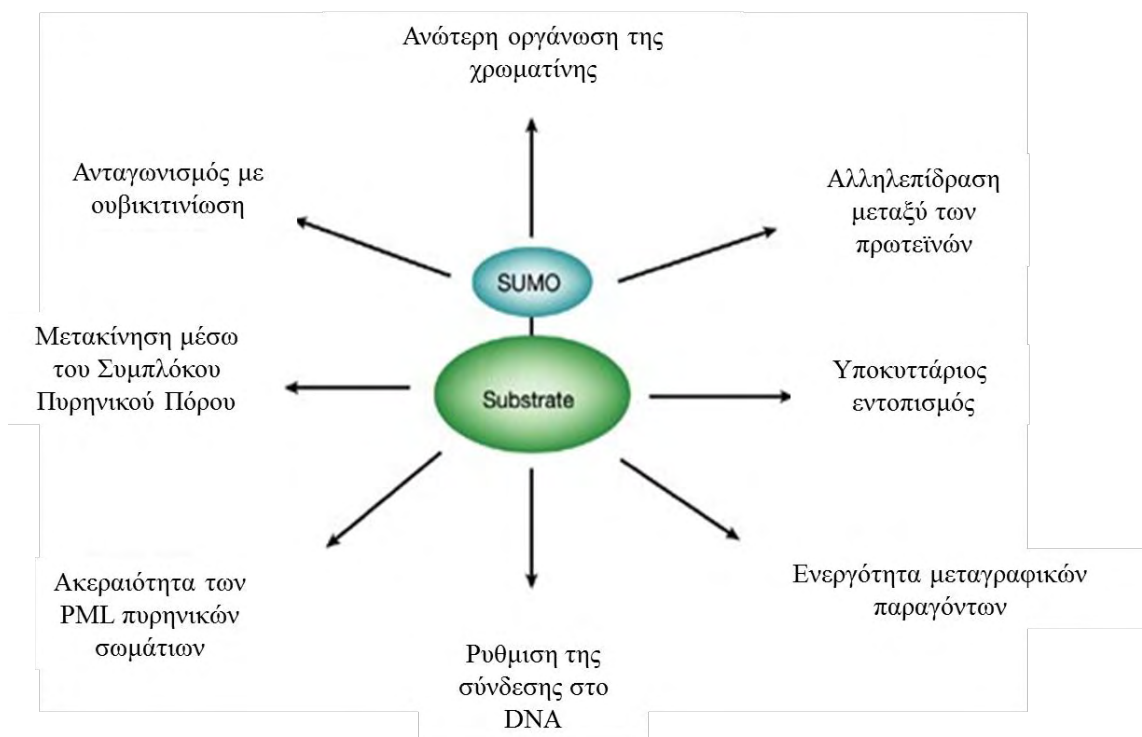
1.2.3 Περιοχές αλληλεπίδρασης με SUMO (SUMO Interaction Motif, SIM)

Εκτός από την ομοιοπολική τροποποίηση με SUMO υπάρχει και μη ομοιοπολική αλληλεπίδραση μεταξύ SUMO και πολλών πρωτεϊνών. Η τροποποίηση αυτή συμβαίνει μέσω ειδικών περιοχών που αποτελούνται από διακλαδισμένα υδρόφοβα αμινοξέα, συνήθως (V/I)-X-(V/I)-(V/I) ή (V/I)-(V/I)-X-(V/I) και πλαισιώνονται συνήθως από κατάλοιπα σερίνης ή άλλα αρνητικά φορτισμένα αμινοξέα. Μέσω αυτών των περιοχών μπορούν να επιτευχθούν ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών και SUMO πεπτιδίων. Περιοχές SIM έχουν βρεθεί σε πολλές πρωτεΐνες και ένζυμα, καθώς και σε πρωτεΐνες-στόχους για σουμοϋλίωση. Εξαιτίας αυτής της ιδιότητας των σουμοϋλιωμένων πρωτεϊνών να δημιουργούν επιπλέον επιφάνειες αλληλεπίδρασης μέσω SIM περιοχών με άλλες πρωτεΐνες είναι δυνατή η υποκυττάρια χωροθέτηση διαφόρων πρωτεϊνών πχ., η

συγκράτηση μεταγραφικών παραγόντων σε πυρηνικά σωμάτια (π.χ. PML bodies) και η στρατολόγηση παραγόντων για την ανώτερη οργάνωση της χρωματίνης (20).

1.2.4 Ο ρόλος της σουμοϋλίωσης στο κύτταρο

Πάρα πολλές πρωτεΐνες, κυρίως πυρηνικές, έχουν βρεθεί να είναι στόχοι της SUMO και αρκετές διαφορετικές λειτουργίες έχουν αποδοθεί σε αυτή τη μετα-μεταφραστική τροποποίηση (*Εικόνα 6*). Η παρατήρηση ότι η σουμοϋλίωση του RanGAP1 είναι απαραίτητη για τη στόχευσή του από το κυτταρόπλασμα στον πυρηνικό πόρο, έδειξε ότι είναι μια σημαντική τροποποίηση για τη λειτουργία της μετακίνησης των πρωτεϊνών από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα (18). Ανάμεσα στις πρωτεΐνες που έχουν βρεθεί να είναι τροποποιημένες με SUMO είναι κυρίως μεταγραφικοί παράγοντες. Ο ρόλος της SUMO στη δράση των μεταγραφικών παραγόντων είναι πολλαπλός και μπορεί να έχει τόσο ανασταλτική όσο και ενεργοποιητική δράση (20, 21). Η σουμοϋλίωση μπορεί να προκαλέσει απομάκρυνση του μεταγραφικού παράγοντα από τον υποκινητή δράσης του και τη συγκράτησή του σε συγκεκριμένα διαμερίσματα μέσα στον πυρήνα. Ένα παράδειγμα είναι αυτό της Sp3 (Specificity Protein) που όταν οι συνθήκες επιτρέπουν την πρόσδεση του SUMO, ο μεταγραφικός παράγοντας εντοπίζεται σε πυρηνικά σωμάτια και στην περιφέρεια του πυρήνα, ενώ όταν είναι αποσουμοϋλιωμένος και ενεργός εντοπίζεται διάχυτος στον πυρήνα (22). Σε μια λίγο διαφορετική περίπτωση, οι μεταγραφικοί παράγοντες HSF1 και HSF2 (Heat Shock Factor) σουμοϋλιώνονται μετά από θερμικό σοκ. Η τροποποίηση αυτή αλλάζει τον πυρηνικό τους εντοπισμό και προκαλεί τη συγκέντρωσή τους σε συγκεκριμένους χώρους μέσα στον πυρήνα. Το αποτέλεσμα από αυτή την τροποποίηση, είναι η ενεργοποίηση της ικανότητας πρόσδεσης των HSF1 και HSF2 στο DNA και κατά συνέπεια η μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων στόχων τους (23). Η πρόσδεση της SUMO μπορεί να επηρεάσει επίσης τα μεταγραφικά σύμπλοκα. Ένα παράδειγμα είναι η σουμοϋλίωση του p300, που δεν φαίνεται να αλλάζει τον εντοπισμό του στον πυρήνα αλλά είναι απαραίτητη για την καταστολή της δράσης του, αφού προσφέρει επιφάνεια αλληλεπίδρασης με την HDAC-6 (Histone Deacetylase) (24). Η τροποποίηση με SUMO φαίνεται να επηρεάζει τη μεταγραφή και σε ένα άλλο επίπεδο, αυτό της χρωματίνης. Υπάρχει μία εργασία που δείχνει ότι η ιστόνη H4 σουμοϋλιώνεται και αυτό έχει ως συνέπεια τη στρατολόγηση της απακετυλάσης HDAC-1 και της πρωτεΐνης HP1 (Heterochromatin Protein 1), που είναι χαρακτηριστικά στοιχεία μεταγραφικής καταστολής και αποσιώπησης στην ετεροχρωματίνη (25).



Εικόνα 6 Ο ρόλος της σουμοϋλίωσης πρωτεϊνών στο κύτταρο (21)

1.2.5 Αλλαγές στο γενικό πρότυπο σουμοϋλίωσης σε συνθήκες στρες

Αλλαγές στην σουμοϋλίωση των πρωτεϊνών συνδέονται με καταστάσεις στρες, όπως θερμικό σοκ, έκθεση σε υπερϊώδη και ιονίζουσα ακτινοβολία, οσμωτικό και οξειδωτικό στρες, καθώς και μετά από μόλυνση με ιούς (26). Ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό της σουμοϋλίωσης σε σχέση με άλλους τύπους τροποποιήσεων είναι ότι η διαθεσιμότητα της πρωτεΐνης SUMO αποτελεί περιοριστικό παράγοντα της σουμοϋλίωσης πρωτεϊνών (15). Έχει παρατηρηθεί σε κάποιες περιπτώσεις στρες να αυξάνονται τα επίπεδα των SUMO πρωτεϊνών. Για παράδειγμα, σε καταστάσεις θερμικού σοκ, προκειμένου να εξασφαλιστεί η επιβίωση, έχουμε αύξηση στα επίπεδα των SUMO1 και SUMO2 πρωτεϊνών, καθώς και γενική αύξηση των σουμοϋλιωμένων πρωτεϊνών (27). Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι ο επαγόμενος από το θερμικό σοκ, μεταγραφικός παράγοντας HSF1 σουμοϋλιώνεται, και το αποτέλεσμα της τροποποίησης είναι η ενεργοποίηση της ικανότητας πρόσδεσης του στο DNA (23). Στην περίπτωση του οξειδωτικού στρες, η αποτελεσματικότητα της σουμοϋλίωσης εξαρτάται από τη διάρκεια έκθεσης και την ποσότητα του οξειδωτικού παράγοντα. Προηγούμενες μελέτες, έχουν δείξει ότι η κατεργασία επιθηλιακών κυττάρων καρκίνου μήτρας (HeLa cells) με μεγάλη συγκέντρωση H_2O_2 (100mM) προκαλεί αύξηση των σουμοϋλιωμένων πρωτεϊνών, ενώ σε αντίθεση, μικρότερη συγκέντρωση H_2O_2 (1mM) προκαλεί μείωση (28). Ως πιθανός μηχανισμός για τη μείωση της σουμοϋλίωσης προτείνεται η απενεργοποίηση των E1 και E2 ενζύμων μέσω δημιουργίας δισουλφιδικού δεσμού μεταξύ τους ενώ φαίνεται να επηρεάζονται και οι

ισοπεπτιδάσες SENPs (29). Μείωση στη σουμοϋλίωση έχει παρατηρηθεί και σε περιπτώσεις ικών μολύνσεων όπου πιθανόν τα ένζυμα σύζευξης E1 και E2 απενεργοποιούνται καθώς αποτελούν στόχους των παθογόνων ιών (30).

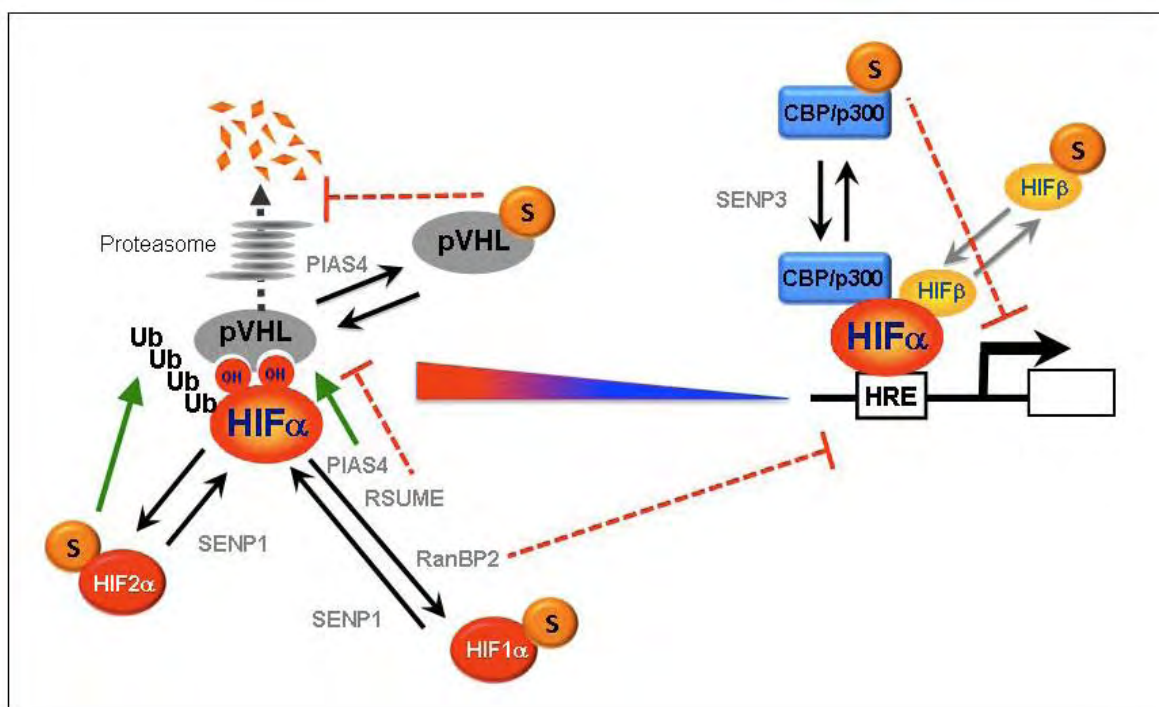
Η υποξία αποτελεί και αυτή μια στρεσογόνο κατάσταση για το κύτταρο. Έχουν παρατηρηθεί, σε μοντέλα ισχαιμίας, αλλαγές στο γενικό πρότυπο σουμοϋλίωσης ωστόσο δεν είναι ξεκάθαρο για το πως η κυτταρική σουμοϋλίωση επηρεάζεται από την υποξία, η οποία διαφέρει από την ισχαιμία. Πιο συγκεκριμένα, έχουν βρεθεί αυξημένα επίπεδα σύζευξης SUMO σε υποξικούς ιστούς εγκεφάλου ποντικών (31), σηματοδοτώντας έναν πιθανό νευροπροστατευτικό ρόλο της σουμοϋλίωσης. Μια ενδιαφέρουσα μελέτη υποστηρίζει πως η πρωτεΐνη RSUME μια πιθανή E3 SUMO λιγάση, (RWD-Containing Sumoylation Enhancer) η οποία εκφράζεται σε διάφορους ιστούς (με μεγαλύτερα επίπεδα έκφρασης σε εγκέφαλο, καρδιά, νεφρά, ήπαρ, πάγκρεας) αυξάνεται στην υποξία κάτι που πιθανά να εξηγεί την γενικότερη αύξηση της σουμοϋλίωσης πρωτεϊνών από τη SUMO1 (32). Ωστόσο η RSUME όπως και οι περισσότερες E3 SUMO λιγάσες φαίνεται να έχει στοχευμένες λειτουργίες σε συγκεκριμένες πρωτεΐνες υποστρώματα παρά μια γενική δράση στο μηχανισμό σουμοϋλίωσης (33).

1.2.6 Σουμοϋλίωση και HIF

Ο HIF-1α έχει βρεθεί ότι σουμοϋλιώνεται στις λυσίνες K391, K477 (*Εικόνα 3*), ωστόσο ο ρόλος της τροποποίησης είναι αμφιλεγόμενος. Η σουμοϋλίωση στην ODD περιοχή του HIF-1α από τη μια έδειξε να αυξάνει τη σταθερότητά του, και επομένως τη μεταγραφική του ενεργότητα (34). Ωστόσο, σε εργασία των Berta et al, υποστηρίζεται ότι η σουμοϋλίωση του HIF-1α με μεσολάβηση της RanBP2 E3 λιγάσης μειώνει την μεταγραφική του ενεργότητα (35). Επίσης η E3 λιγάση PIASy έχει βρεθεί να αυξάνει την σουμοϋλίωση του HIF-1 και να ρυθμίζει αρνητικά την σταθερότητά του και τη μεταγραφική του δράση (36).

Εκτός από τον HIF-1α, και άλλα συστατικά του μονοπατιού της υποξίας έχουν βρεθεί να σουμοϋλιώνονται (*Εικόνα 7*). Ο ARNT έχει βρεθεί ότι σουμοϋλιώνεται στην λυσίνη K245, που εντοπίζεται εντός της περιοχής διμερισμού, με αποτέλεσμα να μην μπορεί να γίνει η αλληλεπίδραση με τον HIF-1α και να έχουμε μείωση της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1. Οι πρωτεΐνες CBP/p300 επίσης σουμοϋλιώνονται με συνέπεια να έχουμε γενικά καταστολή στη δράση τους ως μεταγραφικοί συνενεργοποιητές (24). Έτσι, στο μονοπάτι της υποξίας προκαλείται μείωση της μεταγραφικής ενεργότητας ενώ η αποσουμοϋλίωση από τις SENPs αυξάνει την ικανότητα σύνδεσης τους με τον HIF1α (37). Τέλος έχει δειχθεί ότι ο παράγοντας pVHL συνδέεται με SUMO, με αποτέλεσμα να χάνει τη δράση του σαν E3 λιγάση ουβικιτίνης, και έτσι να μην αποικοδομείται ο HIF (26).

Δεδομένης της σημασίας του μονοπατιού της υποξίας σε διάφορες παθολογίες όπως ο καρκίνος, παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον η καλύτερη κατανόηση του ρόλου της σουμοϋλίωσης στην κυτταρική απόκριση στην υποξία αλλά και σε μελλοντικά πιθανά μοντέλα θεραπευτικών προσεγγίσεων.

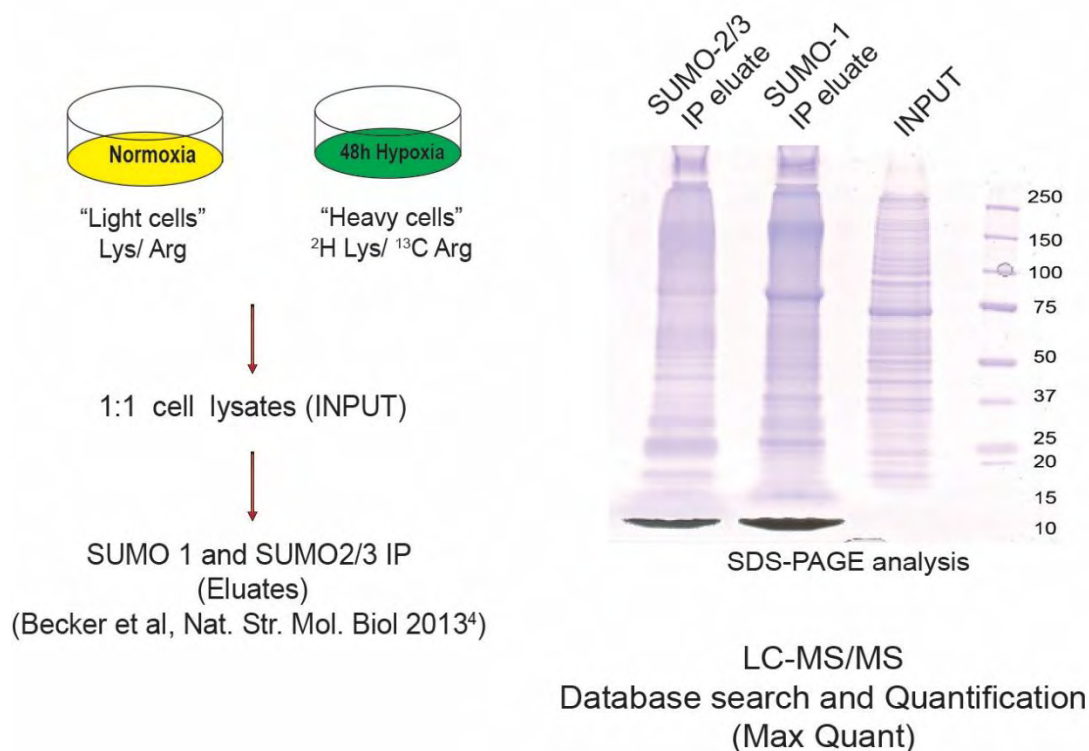


Εικόνα 7 Ο ρόλος της σουμοϋλίωσης στο μονοπάτι της υποξίας (26)

1.2.7 Ο ρόλος της σουμοϋλίωσης στην υποξία: Προκαταρκτικά πειράματα (ZMBH-Πανεπιστήμιο Χαιδελβέργης και Εργαστήριο Βιοχημείας Ιατρική Λάρισας)

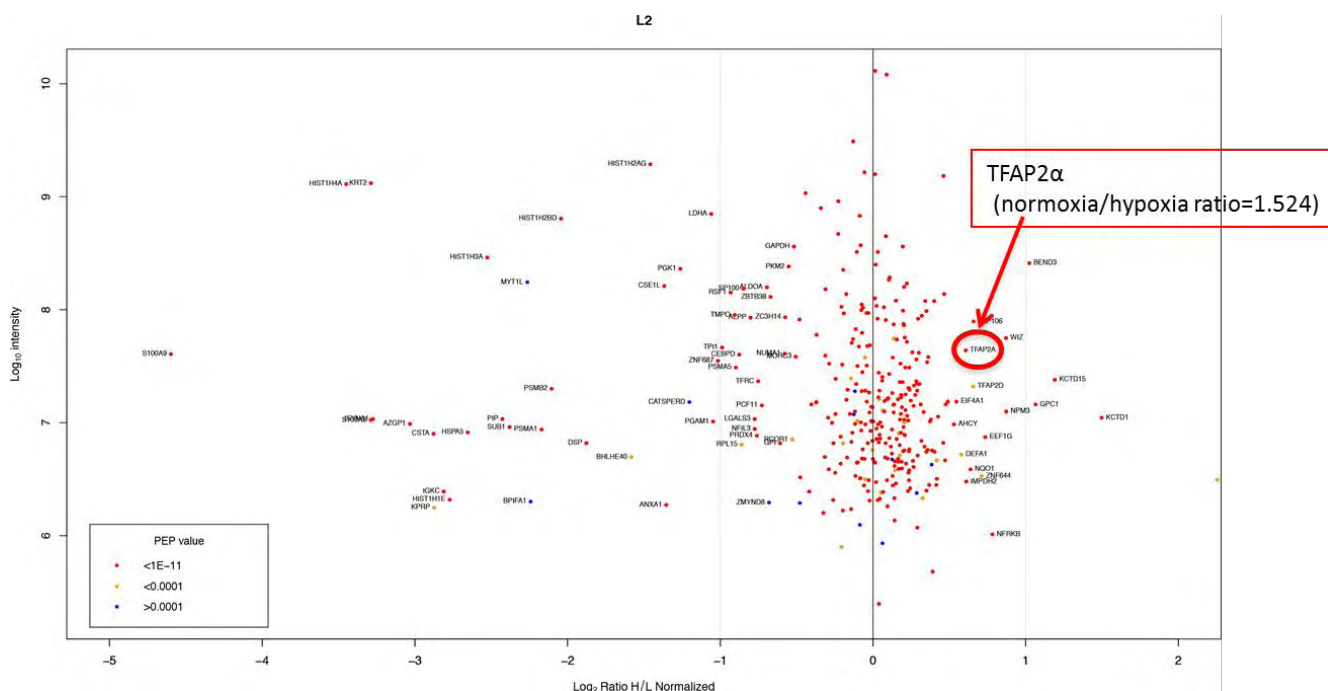
Έχοντας ως στόχο να μελετηθεί εάν η υποξία επηρεάζει το γενικό πρότυπο σουμοϋλίωσης κυτταρικών πρωτεϊνών ένα μέλος του εργαστηρίου Βιοχημείας της Ιατρικής Λάρισας (Γεωργία Χαχάμη, Λέκτορας Κυτταρικής Βιοχημείας και επιβλέπουσα της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης) στα πλαίσια της μεταδιδακτορικής της έρευνας διεξήγαγε πείραμα ποσοτικής ανάλυσης όλων των σουμοϋλιωμένων πρωτεϊνών (SUMO-Screen) σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας (Center for Molecular Biology, Group leader: F. Melchior, Heidelberg, Germany). Η διαδικασία έγινε ως εξής: κύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε διαφορετικές συνθήκες (νορμοξία και 1% υποξία) σε θρεπτικό υλικό με μη ραδιενεργά σημασμένα αμινοξέα (Stable Isotopic Labeling by Amino acids in Cell culture-SILAC) συλλέχθηκαν μετά από 48 ώρες και ακολούθησε ανοσοκατακρήμνιση των σουμοϋλιωμένων πρωτεϊνών των δύο κυτταρικών εκχυλισμάτων με αντισώματα έναντι των SUMO1 και SUMO2, χρησιμοποιώντας ένα ειδικό πρωτόκολλο που αναπτύχθηκε στο ZMBH (Center for Molecular Biology, Group leader: F. Melchior, Heidelberg, Germany)(38) (Εικόνα 8). Ακολούθησε ποσοτική πρωτεομική ανάλυση των ολικών εκχυλισμάτων και των εκλουσμάτων που περιείχαν μόνο τις σουμοϋλιωμένες πρωτεΐνες με LC-MS/MS, για να ποσοτικοποιηθούν τόσο τα

επίπεδα σουμυλίωσης όσο και τα επίπεδα έκφρασης των αντίστοιχων πρωτεϊνών στις συνθήκες νορμοξίας και υποξίας.



Εικόνα 8: Κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε διαφορετικές συνθήκες (νορμοξία και 1% υποξία) σε θρεπτικό υλικό με ισοτοπικά σημασμένες λυσίνες και αργινίνες, συλλέχθηκαν μετά από 48 ώρες και τα κυτταρικά εκχυλίσματα ανοσοκατακρημνίστηκαν με αντισώματα έναντι των SUMO1 και SUMO2 (αδημοσίευτα δεδομένα, Χαχάμη Γ.)

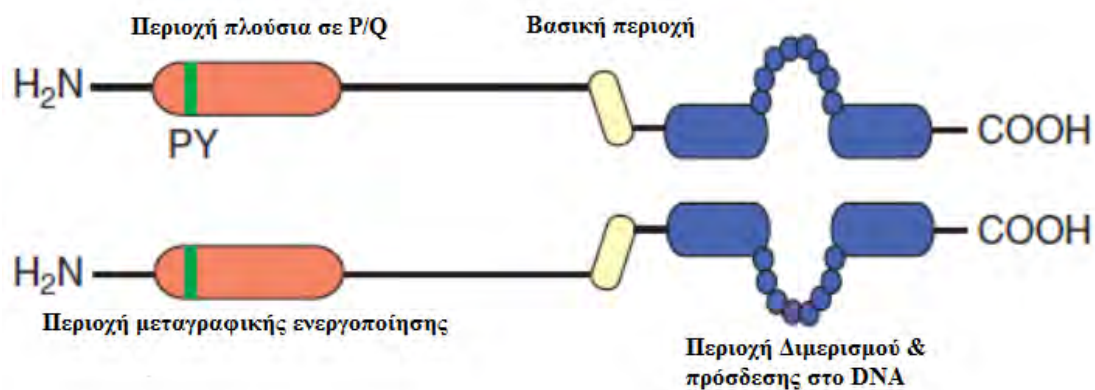
Η ανάλυση των αποτελεσμάτων της φασματοσκοπίας μάζας έδειξε ότι η σουμυλίωση αρκετών πρωτεϊνών αλλάζει, χωρίς να αλλάζουν τα επίπεδα έκφρασής τους. Ορισμένες ταυτοποιημένες πρωτεΐνες (σουμυλιωμένες από τη SUMO-2) φαίνονται στην (Εικόνα 9) (αδημοσίευτα δεδομένα, Χαχάμη Γ.). Ένας από τους στόχους που προέκυψαν είναι ο μεταγραφικός παράγοντας TFAP2α του οποίου τα επίπεδα σουμυλίωσης μειώνονται σχεδόν κατά 1.5 φορές μετά από 48 ώρες σε υποξία (Εικόνα 9). Ο TFAP2α είναι ένας από τους στόχους του οποίου η σουμυλίωση μελετάται στο εργαστήριο περαιτέρω καθώς φαίνεται να σχετίζεται με το μονοπάτι της υποξίας, και είναι ο παράγοντας που αποτελεί και το κύριο θέμα της παρούσας εργασίας.



Εικόνα 9: Ταυτοποίηση δυνητικών υποστρωμάτων για την SUMO2 και η ρύθμισή τους στην υποξία. Στο σχήμα φαίνονται όλες οι πρωτεΐνες που αναγνωρίστηκαν στο SUMO2 IP έκλουσμα (y άξονας είναι η ένταση του σήματος του οργάνου για κάθε πρωτεΐνη, και στον x άξονα είναι ο λόγος των εντάσεων στην νορμοξία προς ένταση στην υποξία για τον ποσοτικό υπολογισμό της μεταβολής των σουμοϋλιωμένων πρωτεϊνών στις 2 συνθήκες.(αδημοσίευτα δεδομένα, Χαχάμη Γ.)

1.3 Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ TFAP2

Η οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων **TFAP2 (Transcription Factors Activating enhancer binding Protein 2, AP2α)** αποτελείται από πέντε διαφορετικές πρωτεΐνες στον άνθρωπο: AP2α, AP2β, AP2γ, AP2δ, AP2ε και κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια. Όλοι οι AP2 μεταγραφικοί παράγοντες φέρουν στο μόριό τους ένα αρκετά συντηρημένο μοτίβο έλικας-θηλιάς-έλικας (helix-loop-helix) στο καρβόξυ-τελικό τους άκρο με το οποίο μπορούν να σχηματίζουν ομοδιμερή και ετεροδιμερή και να προσδεθούν στο DNA, μία βασική περιοχή και μια λιγότερη συντηρημένη περιοχή πλούσια σε προλίνες και γλουταμίνες στο αμινοτελικό άκρο (P/Q rich domain). Επίσης, όλοι, εκτός από τον AP2δ έχουν ένα μοτίβο προλίνης-τυροσίνης XPPXY (PY motif) στην περιοχή μεταγραφικής ενεργότητας στο αμινοτελικό άκρο (Εικόνα 10)(39). Ενεργοποιούν τα γονίδια-στόχους τους, μέσω πρόσδεσης σε cis ρυθμιστικά στοιχεία απόκρισης στον AP2 (AP2RE) που είναι πλούσια σε GC και είναι αρκετά συντηρημένα.



Εικόνα 10: Σχηματική απεικόνιση του AP2α διμερούς. Απεικονίζεται η περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης και η περιοχή που είναι υπεύθυνη για τον διμερισμό και την σύνδεση στο DNA (39).

Οι μεταγραφικοί παράγοντες AP2 εντοπίζονται στον πυρήνα, και είναι υπεύθυνοι για την ενορχήστρωση μιας πληθώρας διαδικασιών στο κύτταρο που περιλαμβάνουν την απόπτωση, την ανάπτυξη και προσκόλληση των κυττάρων, την διαφοροποίηση και την καρκινογένεση. Πιο συγκεκριμένα για τον AP2α έχει βρεθεί ότι παίζει κρίσιμο ρόλο στην ανάπτυξη του εμβρύου. Είναι υπεύθυνος για τον σχηματισμό του νευρικού σωλήνα, μια ομάδα κυττάρων στις πρώτες μέρες του εμβρύου από όπου προέρχονται οι ενήλικοι ιστοί και όργανα. Από το νευρικό σωλήνα σχηματίζονται ιστοί και οστά του προσώπου και του λαιμού. Μεταλλάξεις στο γονίδιο που κωδικοποιεί τον AP2α έχουν ταυτοποιηθεί σε ασθενείς με σύνδρομο BOFS (Branchio-Oculo-Facial Syndrome) (40).

1.3.1 Γονίδια στόχοι των AP2

Υπό τον έλεγχο των AP2 έχουν βρεθεί αρκετά γονίδια, κάποια από αυτά είναι: ο αυξητικός παράγοντας μεταμόρφωσης TGFα (Transforming Growth Factor), ο υποδοχέας οιστρογόνων-α ERα (Estrogen Receptor), γονίδια που είναι υπεύθυνα για τη συνοχή των κυττάρων όπως οι ιντεγκρίνες, η ε-καντχερίνη, ο VEGF (41), και ο υποδοχέας του ανθρώπινου επιδερμικού αυξητικού παράγοντα HER2 (Human epidermal growth factor receptor) (42). Όλα τα παραπάνω γονίδια ενέχονται στα στάδια της καρκινογένεσης, γεγονός που μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι οι μεταγραφικοί παράγοντες AP2 εμπλέκονται στην διαδικασία. Έχουν γίνει αρκετές μελέτες που το αποδεικνύουν, ωστόσο ο ρόλος τους εξαρτάται από το είδος των κυττάρων και μπορεί να διαφέρει μεταξύ των ισομορφών. Εκτός από την άμεση πρόσδεση και την ενεργοποίηση μεταγραφής των

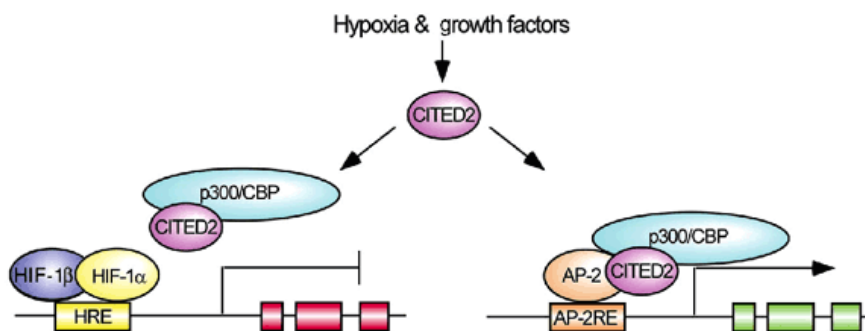
γονιδίων έχουν βρεθεί και αρκετές περιπτώσεις αλληλεπιδράσεων μεταξύ των AP2 και άλλων πρωτεϊνών, οι πιο σημαντικές παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 1

Πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με τους AP2 μεταγραφικούς παράγοντες			
Πρωτεΐνη	Περιγραφή	Αποτέλεσμα αλληλεπίδρασης	Παραπομπή
CITED2	Συνενεργοποιητής	Μεταγραφική ενεργοποίηση	(43)
CITED4	Συνενεργοποιητής	Μεταγραφική ενεργοποίηση	(43)
c-Myc	Ογκο-πρωτεΐνη	Παρεμπόδιση σύνδεσης του Myc/Max με το DNA	(44)
KCTD1	Καταστολέας	Αναστολή δράσης του AP2α	(45)
KCTD15	Καταστολέας	Αναστολή δράσης του AP2α	(46)
PARP	Πολυ-ADP ριβόζη πολυμεραση	Μεταγραφική ενεργοποίηση	(47)
PC4	Συνενεργοποιητής	Μεταγραφική ενεργοποίηση	(48)
P300/CBP	Συνενεργοποιητής	Μεταγραφική ενεργοποίηση	(43)
p53	Ογκο-κατασταλτική πρωτεΐνη	Αύξηση της p53 εξαρτώμενης μεταγραφής	(49)
Rb	Αναστολέας καρκίνου ρετινοβλαστώματος	Μεταγραφική Ενεργοποίηση του γονιδίου της ε-καντερίνης	(50)
Ubc9	E2 λιγάση	Σουμοϋλίωση	(51)

1.3.2 AP2α και υποξία

Ο ρόλος του AP2α, στην υποξία δεν είναι γνωστός καθώς υπάρχουν λίγες μελέτες πάνω στο θέμα, ωστόσο είναι γνωστές αρκετές αλληλεπιδράσεις του AP2α με πρωτεΐνες που ενέχονται στην υποξία, όπως είναι οι παράγοντες p300/CBP και CITED (*Πίνακας 1*). Σε μια ενδιαφέρουσα εργασία των Bhattacharya & Ratcliffe (52) προτάθηκε ο εξής μηχανισμός: η υποξία επάγει την μεταγραφή του CITED2, ο οποίος μπορεί και συνδέεται με τους συνενεργοποιητές p300/CBP με αποτέλεσμα την αναστολή της υποξικής απόκρισης. Ταυτόχρονα, η αλληλεπίδραση με τους p300/CBP προκαλεί επαγωγή της μεταγραφικής ενεργότητας του AP2. Επομένως, CITED, p300/CBP και AP2 αλληλεπιδρούν προκειμένου να επάγουν γονίδια με πιθανή προ-αποπτωτική δράση (*Εικόνα 11*).



Εικόνα 11: Μοντέλο αλληλεπίδρασης CITED και AP2α στην υποξία (52)

Ακόμη έχει βρεθεί σε κύτταρα μελανώματος ότι ο AP2α αλληλεπιδρά με τον HIF2α και όχι με τον HIF1α, και τα κύτταρα που συνέκφρασαν AP2α και HIF2α είχαν χαμηλές διεισδυτικές ικανότητες, στοιχείο που δείχνει στην συγκεκριμένη περίπτωση την αντικαρκινική δράση του AP2α (53). Στη μελέτη των Shi et al (54) σε κύτταρα ρινοφαρυγγικού καρκινώματος, βρέθηκε αλληλεπίδραση μεταξύ του AP2α και του HIF1α. Σε αυτή την περίπτωση τα υψηλά επίπεδα AP2α και HIF1α, σηματοδοτούν αρνητική πρόγνωση για την εξέλιξη του καρκίνου.

Τέλος μια πρόσφατη μελέτη (55), έδειξε ότι η σουμοϋλίωση του AP2α παίζει σημαντικό ρόλο για τη διατήρηση του επιθηλιακού φαινότυπου των κυττάρων καρκίνων του μαστού, ενώ η έλλειψη σουμοϋλίωσης έχει σαν αποτέλεσμα την μετάβαση σε κύτταρα μεσεγχυματικού τύπου. Δεδομένων όλων αυτών των πληροφοριών, συμπεραίνουμε την ανάγκη μελέτης αυτού του μεταγραφικού παράγοντα, καθώς φαίνεται ξεκάθαρα η εμπλοκή του στην πορεία του καρκίνου, χωρίς όμως να υπάρχει ξεκάθαρη εικόνα για την αποπτωτική ή μη δράση του. Σε συνδυασμό με τα ευρήματα που εμπλέκουν το μονοπάτι της σουμοϋλίωσης στην δράση του, κάνουν ακόμα πιο ελκυστική την περαιτέρω μελέτη του.

2 ΣΚΟΠΟΣ

Η παρούσα εργασία είναι μέρος της μελέτης της σουμοϋλίωσης του TFAP2α (AP2α) και του γενικότερου ρόλου της για την κυτταρική απόκριση στην υποξία. Πρώτο βήμα αποτελεί η κλωνοποίηση του AP2α αγρίου τύπου (AP2α wt) καθώς και του μεταλλάγματός του (AP2α mut), που φέρει τη μετάλλαξη στη θέση 10, λυσίνης σε αργινίνη (K10R). Η θέση αυτή έχει προταθεί από τη βιβλιογραφία (51), ως πιθανή θέση σουμοϋλίωσης του μεταγραφικού παράγοντα. Η κλωνοποίηση θα γίνει σε πλασμιδιακό φορέα που φέρει τον επίτοπο HA. Η υπερέκφραση του ανασυνδυασμένου HA-AP2α μπορεί να ανιχνευθεί χρησιμοποιώντας αντίσωμα έναντι του HA.

Οι πλασμιδιακές αυτές κατασκευές θα αποτελέσουν εργαλείο για το δεύτερο σκέλος της διπλωματικής εργασίας που είναι η ανίχνευση της σουμοϋλίωσης του ανασυνδυασμένου HA-AP2α και πως αυτή μεταβάλλεται στην υποξία. Για αυτό το σκοπό θα ακολουθηθεί ένα ειδικό πρωτόκολλο ανοσοκατακρήμνισης (38) προκειμένου να εντοπιστεί η σουμοϋλιωμένη μορφή του HA-AP2α σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας.

Απώτερος στόχος, αποτελεί αφ'ενός η επιβεβαίωση της θέσης σουμοϋλίωσης K10 στον ανασυνδυασμένο HA-AP2α και αφ'ετέρου η επαλήθευση προηγούμενων ευρημάτων που αφορούσαν στη μείωση της σουμοϋλίωσης του ενδογενούς AP2α σε συνθήκες υποξίας.

3 ΥΛΙΚΑ

3.1 Χημικά αντιδραστήρια

Όλα τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην διπλωματική εργασία, ήταν από τις εταιρίες Sigma Aldrich (USA), AppliChem (USA) και Merck (Germany).

3.2 Ένζυμα και υλικά μοριακής βιολογίας

Τα ένζυμα και τα αντιδραστήρια μοριακής βιολογίας που χρησιμοποιήθηκαν ήταν των εταιριών New England BioLabs Inc και Fermentas.

3.3 Βακτηριακά στελέχη

Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα E. Coli TOP10 (Invitrogen). Τα κύτταρα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για μετασχηματισμό πλασμιδιακών κατασκευών και απομόνωση πλασμιδιακού DNA. Παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στη στρεπτομυκίνη.

3.4 Κυτταρικές σειρές

Για τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν αποκλειστικά κύτταρα HeLa, τα οποία είναι ανθρώπινα καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας.

3.5 Υλικά κυτταροκαλλιέργειας

Τα θρεπτικά υγρά καλλιέργειας, οι οροί εμβρύου βοός FBS (Fetal Bovine Serum) και τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν για την καλλιέργεια των ανθρώπινων κυττάρων ήταν του οίκου BIOCHROME (Biochrome, U.K.). Στο θρεπτικό καλλιέργειας προστέθηκε 10% FBS και μίγμα αντιβιοτικών 100U/ml πενικιλίνης και 100U/ml στρεπτομυκίνη.

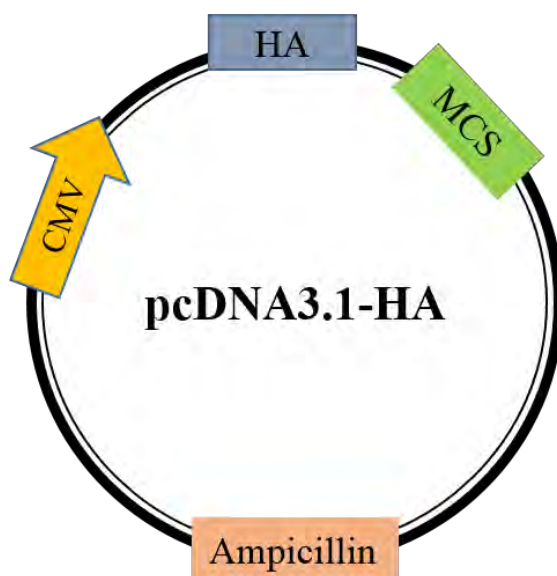
3.6 Πλασμίδια

3.6.1 pcDNA-AP2α wt & pcDNA-AP2α mut

Το πλασμίδιο pcDNA-AP2α wt παραχωρήθηκε από το εργαστήριο του S.Bhattacharya (University of Oxford) και φέρει το cDNA για την ανθρώπινη πρωτεΐνη TFAP2α (Transcription Factor Activator Protein 2-alpha, AP2α) (43). Το πλασμίδιο pcDNA-AP2α mut φέρει μετάλλαξη στο cDNA του AP2α (τροποποιήθηκε από το αρχικό πλσμίδιο pcDNA-AP2α wt με στοχευμένη μεταλλαξιγένεση από την Dr Γεωργία Χαχάμη, Εργαστήριο Βιοχημείας, Ιατρική Λάρισας) ώστε η πρωτεΐνη που προκύπτει να φέρει αλλαγή ενός αμινοξέος (λυσίνη σε αργινίνη, K10R). Οι δύο φορείς χρησιμοποιήθηκαν ως εκμαγείο στις PCR (Polymerase Chain Reaction) για την υποκλωνοποίηση του AP2α αγρίου ή μεταλλαγμένου τύπου στο φορέα pcDNA3.1-HA.

3.6.2 pcDNA 3.1-HA

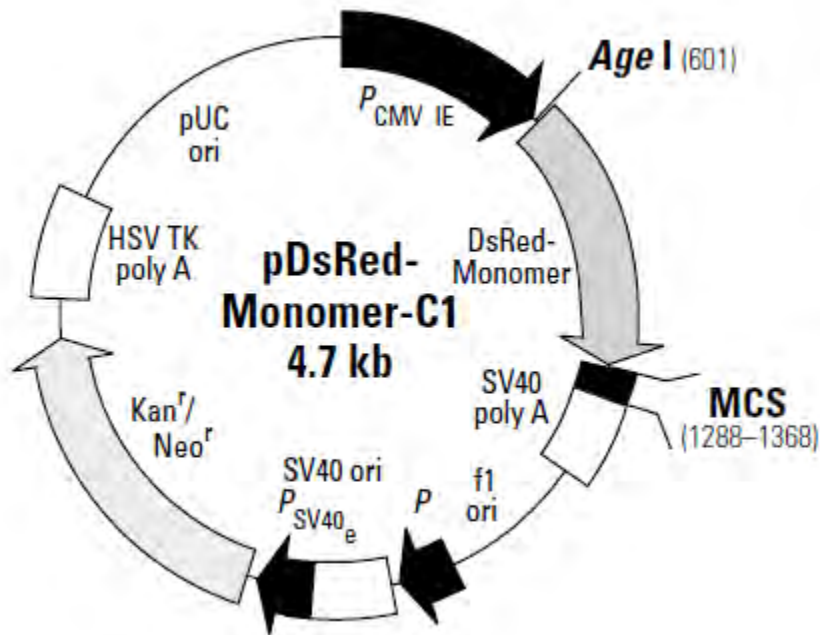
Για την υποκλωνοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα AP2α χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pcDNA 3.1-HA (παραχωρήθηκε από το εργαστήριο της F.Melchior ZMBH, University of Heidelberg, Germany). Στο συγκεκριμένο φορέα τα κλωνοποιημένα γονίδια βρίσκονται κάτω από τον έλεγχο του ευκαρυωτικού υποκινητή CMV. Επίσης ο φορέας περιέχει την αλληλουχία που κωδικοποιεί για ένα πεπτίδιο (YPYDVPDYA) της πρωτεΐνης HA (Human influenza HemAgglutinin) στο αμινοτελικό άκρο της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Το πλασμίδιο επίσης φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη



Εικόνα 12: Πλασμιδιακός φορέας κλωνοποίησης pcDNA-3.1-HA

3.6.3 pDsRed-Monomer-C1 Vector (ClonTech Laboratories, Inc.)

Πλασμίδιο που περιέχει κλωνοποιημένο το cDNA για την κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη RFP (Red Fluorescent Protein), η οποία έχει βέλτιστη απορρόφηση στα 557nm και εκπέμπει φως στα 592nm. Χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα ανοσοφθορισμού.



Εικόνα 13: Χάρτης πλασμιδίου pDsRed-Monomer-C1, (ClonTech)

3.6.4 pcDNA-His-SUMO2

Παραχωρήθηκε απο το εργαστήριο της F.Melchior (ZMBH, Πανεπιστήμιο Χαιδελβέργης Γερμανία). Το πλασμίδιο αυτό περιέχει κλωνοποιημένο το cDNA που κωδικοποιεί για τη SUMO 2 πρωτεΐνη. Επίσης φέρει His επίτοπο ο οποίος αποτελείται απο 6 ιστιδίνες (6x His) και δίνει τη δυνατότητα εντοπισμού και απομόνωσης της πρωτεΐνης με χρήση κατάλληλου anti-His αντισώματος. Φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη.

3.7 Εκκινητές

Οι εκκινητές της PCR κατασκευάστηκαν απο την Eurofins.- Scientific και οι εκκινητές αλληλούχισης από τη VBC-Biotech της εταιρίας Eurofins- Scientific.

Για την ενίσχυση της αλληλουχίας που αντιστοιχεί στον AP2α wt και AP2α mut χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω εκκινητές:

Πρόσθιος: 5'-TCAGAATTCCATGCTTTGGAAATTG-3'

Οπίσθιος: 5'-AGTCTCGAGTCACTTTCTGTG-3'

Με έντονα γράμματα έχουν επισημανθεί οι αλληλουχίες αναγνώρισης απο τα περιοριστικά ένζυμα EcoRI (GAATTC) και XhoI (TCTGAG). Με υπογράμμιση έχουν επισημανθεί οι αλληλουχίες των κωδικονίων έναρξης και λήξης της μετάφρασης (ATG και TCA αντίστοιχα).

Για την αλληλούχιση των πλασμιδίων pcDNA-HA-AP2α wt και pcDNA-HA-AP2α mut χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω εκκινητές:

T7 Universal primer: 5'-TAATACGACTCACTATAGG-3'

BGH REV primer: 5'- TAGAAGGCACAGTCGAGG-3'

3.8 Αντισώματα

Πίνακας 2

Αντισώματα	Προέλευση	Αραίωση	Εταιρία	Τύπος
anti-HA	ποντίκι	1:2500	COVANCE	Μονοκλωνικό
anti-HIF1α	κουνέλι	1:1000	Εργαστήριο Βιοχημείας Λάρισας	Πολυκλωνικό
anti-HIF2α	κουνέλι	1:750	NOVUS	Πολυκλωνικό
anti-AP2α	κουνέλι	1:1000	THERMO	Μονοκλωνικό
anti-His	ποντίκι	1:2000	QIAGEN	Μονοκλωνικό
anti-SUMO2/3	κουνέλι	1:1750	MELCHIOR LAB	Πολυκλωνικό
anti-β-actin	ποντίκι	1:10000	CELL SIGNALING	Πολυκλωνικό
anti-IgG κουνελιού συζευγμένα με HRP (Horseradish Peroxidase)	κατσίκια	1:10000	CELL SIGNALING	Πολυκλωνικό
anti-IgG ποντικίου συζευγμένα με HRP	κατσίκια	1:10000	CELL SIGNALING	Πολυκλωνικό
anti-IgG ποντικίου συζευγμένα με Alexa green 488	κατσίκια	1:1000	Molecular Probes, INVITROGEN	Πολυκλωνικό
anti-IgG κουνελιού συζευγμένα με Alexa Fluor 594	κατσίκια	1:1000	Molecular Probes, INVITROGEN	Πολυκλωνικό

4 ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1 Παρασκευή βακτηρίων δεκτικών σε μετασχηματισμό με πλασμιδιακό DNA

Σε αυτή την τεχνική γίνεται κατεργασία των βακτηρίων σε υψηλή συγκέντρωση αλάτων κατιόντων, κυρίως CaCl_2 με αποτέλεσμα οι κυτταρικές μεμβράνες να γίνονται ευκολότερα διαπερατές σε κυκλικό DNA (π.χ. πλασμίδια).

Αρχικά εμβολιάστηκαν 3ml διαλύματος TYM (2% Tryptone, 0.5% Yeast Extract, 0,1 M NaCl , 10mM MgSO_4) με βακτήρια E.Coli (βρίσκονται σε διάλυμα αποθήκευσης με γλυκερόλη στους -80°C), παρουσία Στρεπτομυκίνης (100μg/μl). Η καλλιέργεια επώαστηκε για 12-16 ώρες στους 37°C υπό ανακίνηση. Από αυτήν την καλλιέργεια εμβολιάστηκαν 5 ml θρεπτικού υλικού TYM. Η νέα καλλιέργεια επώαστηκε για 2-3 ώρες στους 37°C υπό ανακίνηση. Κατόπιν εμβολιάστηκαν με 30μl από την καλλιέργεια αυτή 3 ml θρεπτικού μέσου TYM, το οποίο δεν περιέχει αντιβιοτικό. Η καλλιέργεια επώαστηκε στους 37°C μέχρις ότου η οπτική της πυκνότητα φτάσει $\text{OD}_{600} = 0.35 - 0.4$. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρωση $4000 \times g$ για 5 λεπτά στους 4°C και αιωρήθηκαν σε 25 ml ρυθμιστικού διαλύματος TFB-I (100 mM KCl , 10 mM CaCl_2 , 50 mM MnCl_2 , 15% γλυκερόλη και 100 mM CH_3COOK με pH 7), και επώαστηκαν στον πάγο για 10 λεπτά. Ακολούθησε φυγοκέντρωση για 5 λεπτά στις $4000 \times g$ και τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε 2 ml ρυθμιστικού διαλύματος TFB-II (10 mM MOPS, 75 mM CaCl_2 , 10 mM KCl , 20% γλυκερόλη με pH 7). Το αιώρημα επώαστηκε σε πάγο για 60min και τέλος μοιράστηκε σε σωλήνες μικροφυγοκέντρου (τύπου erendorf) και αποθηκεύτηκαν στους -80°C .

4.2 Ενίσχυση γονιδιακής αλληλουχίας του AP2a wt και AP2a mut με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).

Με τη μέθοδο αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polumerase Chain Reaction, PCR) είναι δυνατό να ενισχυθούν συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA μέσω συμπληρωματικών ολιγονουκλεοτιδίων (εκκινητών) και θερμοάντοχων πολυμερασών σε συνθήκες αποδιάταξης, υβριδοποίησης και επιμήκυνσης οι οποίες επαναλαμβάνονται σε κύκλους. Κατά αυτόν τον τρόπο το τμήμα DNA που θέλουμε να ενισχύσουμε μπορεί να παράγεται εξειδικευμένα και σε μεγάλες ποσότητες.

Στην παρούσα μελέτη ενισχύθηκαν οι αλληλουχίες cDNA που κωδικοποιούν τον μεταγραφικό παράγοντα AP2a wt και AP2a mut

Το μίγμα της αντίδρασης πολυμεράσης περιείχε:

- 100 ngr εκμαγείο (pcDNA-AP2a wt/mut)
- 1,5 μl πρόσθιο εκκινητή (10pmol/μl)
- 1,5 μl οπίσθιο εκκινητή (10pmol/μl)

- 1.5 µl DMSO
- 5 µl 2mM dNTPs
- 10 µl 5x KAPA HiFi buffer GC Rich (Takara)
- 1 U KAPA HiFi πολυμεράση (Takara)
- H₂O έως όγκο 50 µl

Οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν οι παρακάτω:

- 1) Αρχική αποδιάταξη 95°C για 2 min
 - Αποδιάταξη 95°C για 20 sec
 - Υβριδοποίηση 52°C για 15 sec
 - Επιμήκυνση 72°C για 1,5 min

Αριθμός κύκλων 35

Τελική επιμήκυνση 72°C για 5 min

- 2) Αρχική αποδιάταξη 95°C για 2 min
 - Αποδιάταξη 98 °C για 20 sec
 - Υβριδοποίηση 52 °C για 15 sec
 - Επιμήκυνση 72 °C για 1,5 min

5 κύκλοι

- Αποδιάταξη 98 °C για 20 sec
- Υβριδοποίηση 51 °C για 15 sec
- Επιμήκυνση 72 °C για 1,5 min

10 κύκλοι

- Αποδιάταξη 98 °C για 20 sec
- Υβριδοποίηση 50 °C για 15 sec
- Επιμήκυνση 72 °C για 1,5 min

10 κύκλοι

- Αποδιάταξη 98 °C για 20 sec
- Υβριδοποίηση 49°C για 15 sec
- Επιμήκυνση 72 °C για 1,5 min

15 κύκλοι

Τελική επιμήκυνση 72 °C για 5 min.

4.3 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση αποτελεί μία ποιοτική μέθοδο ανάλυσης του DNA. Η πηκτή είναι ένα πολυμέρες αγαρόζης που περιέχει ένα δίκτυο μικροσκοπικών πόρων. Το διάλυμα DNA τοποθετείται στο ένα άκρο της πηκτής σε ειδικά διαμορφωμένες εγκοπές. Όταν εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο διαμέσου της πηκτής, γραμμικά μόρια DNA κινούνται προς την άνοδο (λόγω των αρνητικών φορτίων των φωσφορικών ομάδων των μορίων) με ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογη προς το μέγεθός τους. Αυτό συμβαίνει γιατί τα μεγαλύτερα τμήματα βρίσκουν μεγαλύτερη αντίσταση κινούμενα μέσα από το δίκτυο της αγαρόζης. Έτσι τα τμήματα του DNA διαχωρίζονται σύμφωνα με το μέγεθός τους. Το μέγεθος των πόρων του δικτύου της πηκτής και κατά συνέπεια το εύρος μεγέθους των μορίων DNA που μπορούν να διαχωριστούν εξαρτάται από τη συγκέντρωση της αγαρόζης. Όσο μεγαλύτερη η συγκέντρωση τόσο μικρότεροι θα είναι οι πόροι του δικτύου και τόσο μικρότερα μόρια DNA μπορούν να διαχωριστούν. Το DNA γίνεται ορατό μέσα στην πηκτή με τη βοήθεια του βρωμιούχου αιθιδίου, μιας φθορίζουσας χρωστικής η οποία παρεμβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις του DNA.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν πηκτές με συγκέντρωση 1% αγαρόζης, σε ρυθμιστικό διάλυμα TAE (0.04 M Tris-οξικό, 0.001 M EDTA και pH 8.0), παρουσία και βρωμιούχου αιθιδίου (σε τελική συγκέντρωση 0,5 µg/ml). Στα προς ηλεκτροφόρηση δείγματα DNA προστέθηκε διάλυμα φόρτωσης (5% γλυκερόλη, 0.42% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0.42% κυανού του ξυλενίου). Η ηλεκτροφόρηση έγινε για 30 λεπτά στα 120V.

4.4 Απομόνωση DNA από πηκτή αγαρόζης με χρήση εμπορικού kit.

Στην παρούσα εργασία η απομόνωση και ο καθαρισμός του DNA έγινε με χρήση του Gel Extraction kit της Qiagen. Η απομόνωση τμημάτων DNA σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή βασίζεται στην ιδιότητα του DNA να προσροφάται από ειδικά σφαιρίδια στήλης, παρουσία υψηλής συγκέντρωσης αλάτων.

Το κομμάτι αγαρόζης που περιέχει το τμήμα του DNA που μας ενδιαφέρει αποκόπηκε από την πηκτή αγαρόζης και τοποθετήθηκε σε διάλυμα διαλυτοποίησης QC αγαρόζης, σε αναλογία 300 µl/100 mg πηκτής. Ακολούθησε θέρμανση για 10 λεπτά στους 50°C με περιοδική ανάδευση ώστε να διαλυτοποιηθεί η πηκτή και να απελευθερωθεί το DNA στο διάλυμα. Το μίγμα μεταφέρθηκε σε στήλη Qiaquick και φυγοκεντρήθηκε στις 13.400 rpm για 1 λεπτό, προκειμένου να προσδεθεί το DNA στο υλικό της στήλης. Στη συνέχεια ακολούθησαν πλύσεις της στήλης με διάλυμα PE, ώστε να απομακρυνθούν οι τυχόν προσμίξεις. Η στήλη επαναφυγοκεντρήθηκε και στη συνέχεια το DNA εκλούστηκε με προσθήκη 30 µl H₂O.

4.5 Πέψη πλασμιδιακού DNA με ένζυμα περιορισμού.

Για πέψη τμημάτων DNA χρησιμοποιήθηκαν περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Αυτές είναι ειδικά ένζυμα που αναγνωρίζουν και πέπτουν εξειδικευμένα συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA. Η πέψη επιτρέπει τη δημιουργία συμπληρωματικών άκρων στο DNA, γεγονός που επιτρέπει την σύνδεση τους με άλλα μόρια DNA που έχουν κοπεί με την ίδια περιοριστική ενδονουκλεάση.

Πέψη με περιοριστικά ένζυμα EcoRI και XhoI για τη δημιουργία επιθυμητών άκρων στο ένθεμα και στον φορέα κλωνοποίησης:

Σε τελικό όγκο αντίδρασης 50μl προστέθηκαν

30 μl (1-2μgr) έκλουσματος DNA

10 U EcoRI (HF-High Fidelity)

10 U XhoI

5 μl NEB CutSmart Buffer 10x

H₂O (τελικός όγκος 50μl)

Έγινε επώαση στους 37°C 2-3 hrs.

Πέψη των πλασμιδίων με περιοριστικές ενδονουκλεάσες για έλεγχο ύπαρξης του ενθέματος.

Στο μίγμα αντίδρασης προστέθηκαν

1 μgr DNA

2μl 10x NEB Buffer (1,2,3 ή CutSmart)

5 units απο το ένζυμο περιορισμού

H₂O σε τελικό όγκο αντίδρασης 20μl

Η επώαση έγινε για 2-3 hrs στους 37°C.

4.6 Καθαρισμός του παραγόμενου DNA με χρήση εμπορικού kit.

Προκειμένου να απομακρυνθούν τα ένζυμα περιορισμού και τα διαλύματα πέψης έγινε ένα ακόμη βήμα καθαρισμού του DNA μέσω στήλης ανταλλαγής ιόντων. Ο καθαρισμός έγινε με τη χρήση του Plasmid DNA Purification kit της Macherey-Nagel.

Αρχικά έγινε μίξη του διαλύματος DNA με το αντιδραστήριο A3, σε κατάλληλο όγκο σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας. Το μίγμα μεταφέρθηκε σε κατάλληλη στήλη. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 13400 rpm για 1 λεπτό προκειμένου να συνδεθεί το DNA στο υλικό της στήλης. Στη συνέχεια προστέθηκαν 600μl απο το διάλυμα πλύσης A4 και η στήλη φυγοκεντρήθηκε στα 13400rpm για 1 λεπτό. Ακολούθησε επαναφυγοκέντρηση στα 13400rpm για 2 λεπτά και έκλουση του DNA σε 20μl H₂O.

4.7 Αντίδραση λιγάσης

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην ιδιότητα της DNA λιγάσης του βακτηριοφάγου T4 να καταλύει την δημιουργία φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ των 3-υδροξυλικών και 5-φωσφορικών άκρων και τη σύνδεση τμημάτων DNA. Για την αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν πλασμίδια και ενθέματα σε αναλογία 1:3 (50ngr φορέα : 150 ngr ένθεμα) , 400 U Λιγάση T4-DNA (NEB), 1x Buffer λιγάσης και H₂O. Ακολούθησε ολονύχτια επώαση στους 16°C.

4.8 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων E.Coli με πλασμιδιακό φορέα

Μετασχηματισμός ονομάζεται το φαινόμενο εισαγωγής ξένου DNA σε βακτήρια δέκτες. Είναι μια διαδικασία που συμβαίνει φυσιολογικά στα βακτήρια, αλλά βρίσκει και εφαρμογή στην Μοριακή Βιολογία με σκοπό τη μεταφορά ανασυνδυασμένου DNA σε βακτήρια και την έκφραση των αντίστοιχων ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών.

Η διαδικασία του μετασχηματισμού που ακολουθήθηκε είναι η εξής: σε 50 μl του αιωρήματος των δεκτικών βακτηρίων προστέθηκε το πλασμιδιακό DNA (50-100ngr DNA). Τα κύτταρα επώαστηκαν στον πάγο για 30 λεπτά και στο τέλος αυτού του χρονικού διαστήματος υπέστησαν θερμικό σοκ για 1 λεπτό στους 42°C. Κατόπιν προστέθηκε θρεπτικό υλικό 1 ml L.B. (LURIA BROTH-Tryptone 1% w/v, Yeast extract 0.5% w/v, NaCl 1%) και ακολούθησε επώαση των βακτηρίων για τουλάχιστον 1 ώρα στους 37°C με ανάδευση (170rpm). Μετά από φυγοκέντρηση 1 λεπτού στις 5000 x g έγινε επαναιώρηση των κυττάρων σε 100-150μl LB. Το αιώρημα των βακτηριακών κυττάρων επιστρώθηκε στην επιφάνεια τρυβλίου με θρεπτικό υλικό LB-άγαρ (2% άγαρ) που περιέχει 100 μg/ml αμπικιλίνη, ως αντιβιοτικό επιλογής.

Τα τρυβλία επώαστηκαν στους 37°C για 16-18 ώρες. Η επιλογή των μετασχηματισμένων βακτηριακών κυττάρων έγινε παρουσία αμπικιλίνης διότι οι πλασμιδιακοί φορείς και άρα τα μετασχηματισμένα με αυτούς κύτταρα περιέχουν το γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό αυτό. Ακολούθησε συλλογή επιλεγμένων αποικιών σε υγρό θρεπτικό μέσο LB/αμπικιλίνης για την απομόνωση του πλασμιδιακού DNA.

4.9 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας με αλκαλική λύση

Η τεχνική αυτή στηρίζεται στη λύση των κυττάρων, διαχωρισμό του πλασμιδιακού DNA από τις πρωτεΐνες και το χρωμοσωμικό DNA και τέλος απομόνωση του σε σχεδόν καθαρή μορφή. Η λύση των κυττάρων γίνεται με τη βοήθεια του SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) το οποίο διαλυτοποιεί τις κυτταρικές μεμβράνες και αποδιατάσσει τις περισσότερες πρωτεΐνες, ενώ η προσθήκη NaOH βοηθάει στο σπάσιμο του δεσμών υδρογόνου μεταξύ των συμπληρωματικών βάσεων του DNA, μετατρέποντάς το έτσι σε μονόκλωνο. Στη συνέχεια, η προσθήκη του CH₃COOK μειώνει την αλκαλικότητα του μείγματος ώστε να ξανασχηματιστούν οι δεσμοί υδρογόνου ανάμεσα στις βάσεις του DNA. Το μικρό πλασμιδιακό DNA μπορεί εύκολα να επαναδιαταχθεί, ενώ δεν ισχύει το ίδιο

για τα μεγάλα τμήματα του χρωμοσωμικού DNA. Έτσι το διαλυτό πλασμιδιακό DNA παραλαμβάνεται στο υπερκείμενο, απ' όπου κατακρημνίζεται με την προσθήκη ισοπροπανόλης και τα τυχόν εναπομείναντα άλατα διαλύονται από την αιθανόλη.

Η διαδικασία έχει ως εξής: βακτηριακή καλλιέργεια 3 ml LB που περιέχει αντιβιοτικό επιλογής αναπτύχθηκε για 16 ώρες στους 37°C. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση στις 4000 rpm για 6 λεπτά και το ίζημα των κυττάρων επαναιωρήθηκε σε 300 μl διαλύματος P1 (50 mM Tris pH 8.0, 10 mM EDTA) στο οποίο είχε προστεθεί 0.1 mg/ml RNase A. Στη συνέχεια προστέθηκαν 300 μl διαλύματος λύσης των κυττάρων P2 (200 mM NaOH, 1% SDS) και έγινε ήπια ανάδευση ώστε να καταστεί ομογενές. Μετά από διάστημα 3 λεπτών σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, προστέθηκαν 300 μl διαλύματος εξουδετέρωσης P3 (3 M οξικό κάλιο pH 5.5). Μετά από ήπια ανακίνηση ακολούθησε φυγοκέντρηση για 40 λεπτά στα 14.000 rpm. Στο υπερκείμενο που περιείχε το πλασμιδιακό DNA, προστέθηκε ισοπροπανόλη και φυγοκέντρηση στα 13400rpm για 30 λεπτά. Η ισοπροπανόλη κατακρημνίζει το DNA, το οποίο παραλήφθηκε σαν ίζημα μετά τη φυγοκέντρηση. Το ίζημα ξεπλήθηκε με 70% αιθανόλη και φυγοκεντρήθηκε για 15 λεπτά στα 13400rpm. Το ίζημα αφέθηκε να ξεραθεί σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια επαναιωρήθηκε σε 20 μl H₂O.

4.10 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μεσαίας κλίμακας με χρήση εμπορικού kit.

Η απομόνωση και ο καθαρισμός πλασμιδιακού DNA μεσαίας κλίμακας έγινε χρησιμοποιώντας το NucleoBond Xtra midi kit της Macherey-Nagel. Βασίζεται στην αρχή της αλκαλικής λύσης των βακτηριακών κυττάρων με ειδικά διαλύματα και δέσμευση του πλασμιδιακού DNA παρουσία χαοτρόπων αλάτων σε ειδική στήλη ρητίνης διοξειδίου του πυριτίου.

Βακτηριακή καλλιέργεια 100 ml LB που περιέχει αμπικιλίνη επώαστηκε για 16 ώρες στους 37°C και τα κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση στις 5000 x g για 10 λεπτά, στους 4°C. Το ίζημα των κυττάρων αιωρήθηκε σε 8 ml διαλύματος RES (+ RNase A). Στη συνέχεια τα κύτταρα λύθηκαν με προσθήκη 8 ml διαλύματος λύσης (LYS), με ήπια ανάδευση ώστε να καταστεί ομογενές. Μετά από διάστημα 5 λεπτών σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, προστέθηκαν 8 ml διαλύματος εξουδετέρωσης (NEU), ενώ συγχρόνως έγινε και η εξισορρόπηση της στήλης με 10 ml διαλύματος εξισορρόπησης (EQU). Το μίγμα διαβιβάστηκε από τη στήλη. Ακολούθησε πλύση της στήλης δύο φορές, με τα διάλυματα EQU και (WASH), ώστε να απομακρυνθούν τυχόν προσμίξεις από την προηγούμενη κατεργασία. Η έκλουση του πλασμιδιακού DNA έγινε με τη διέλευση 5 ml διαλύματος έκλουσης (ELU). Η κατακρήμνιση του DNA στο διάλυμα έκλουσης έγινε με προσθήκη 3,5 ml ισοπροπανόλης και φυγοκέντρηση στις 10000 x g για 30 λεπτά, 4°C. Ακολούθησε μια πλύση με 2 ml 70% αιθανόλης και το ίζημα που παραλήφθηκε μετά από νέα φυγοκέντρηση στις 10000 x g για 10 λεπτά, ξηράνθηκε και επαναιωρήθηκε σε H₂O.

4.11 Καλλιέργεια ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας (HeLa). Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) & 10% ορό FBS+PS, και σε τρυβλία διαμέτρου 10 cm. Επώαστηκαν σε υγρανόμενο θάλαμο επώασης στους 37°C και 5% CO₂. Όλοι οι χειρισμοί των κυττάρων έγιναν σε θάλαμο νηματικής ροής, ώστε να μειωθεί ο κίνδυνος επιμολύνσεων.

Η επανακαλλιέργεια των κυττάρων γινόταν ανα 48 ώρες (όπου τα κύτταρα καταλαμβάναν περισσότερο από το 80% της επιφάνειας του τρυβλίου) έως εξής: αρχικά τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με αποστειρωμένο διάλυμα 1×PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1.46 mM KH₂PO₄) και αποκολλήθηκαν από τον πάτο του τρυβλίου μετά από επώαση 5 λεπτών με το ένζυμο τρυψίνη. Στη συνέχεια τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε νέο θρεπτικό μέσο και μεταφέρθηκαν σε νέο τρυβλίο σε κατάλληλη αραιώση (συνήθως 1/10).

Για την δημιουργία υποξικών συνθηκών (1% O₂), τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε ειδικό κλειστό θάλαμο 3 αερίων (INVIVO₂ 200, RUSKINN).

4.12 Πάγωμα κυττάρων και επανέναρξη καλλιέργειών

Για τη διατήρηση κυττάρων στους -80°C ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία: αρχικά τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με κρύο PBS και αποκολλήθηκαν από το τρυβλίο με τρυψίνη. Στη συνέχεια τα κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση και επαναιωρήθηκαν σε 2 ml θρεπτικού υλικού ψύξης (10% DMSO σε FBS) και αποθηκεύτηκαν στους -80 °C για 24 ώρες και στη συνέχεια σε υγρό άζωτο, σε ειδικούς μικροσωληνίσκους cryotubes.

Για την επανέναρξη καλλιέργειών έγινε γρήγορο ξεπάγωμα των αποθηκευμένων κυττάρων στους 37 °C και στη συνέχεια προστέθηκαν στάγδην 10ml θρεπτικού υλικού. Ακολούθησε φυγοκέντρηση των κυττάρων στα 800 rpm για 3 λεπτά και αφαίρεση του υπερκείμενου. Το ίζημα των κυττάρων επαναιωρήθηκε σε 10 ml νέου θρεπτικού υλικού και μεταφέρθηκε σε τρυβλίο για περαιτέρω επώαση στους 37 °C, 5% CO₂.

4.13 Παροδική διαμόλυνση κυττάρων με ανασυνδυασμένα πλασμίδια, με τη βοήθεια κατιονικών μορίων

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την εισαγωγή πλασμιδιακού DNA σε ευκαρυωτικά κύτταρα θηλαστικών και την έκφραση των κλωνοποιημένων γονιδίων ως πρωτεΐνες σύντηξης με χαρακτηριστικές αλληλουχίες που είναι εύκολα ανιχνεύσιμες.

Στην παρούσα εργασία, η παροδική διαμόλυνση κυττάρων βασίζεται στην αργή μίξη του πλασμιδιακού DNA με κατιονικής φύσης παράγοντες επιμόλυνσης όπως η πολυαιθυλενιμίνη (polyethylenimine, PEI). Οι θετικά ενώσεις σχηματίζουν πολυμερή σύμπλοκα με τις αρνητικά φορτισμένες αλυσίδες του νουκλεϊκού οξέος. Έτσι σε υδατικό περιβάλλον επιτυγχάνεται η

δημιουργία συμπλόκων με θετικά φορτισμένη επιφάνεια. Το θετικό φορτίο της επιφάνειας των πολυμερών μεσολαβεί επίσης στην αλληλεπίδραση του συμπλόκου με την αρνητικά φορτισμένη κυτταρική μεμβράνη, επιτρέποντας την ενδοκύτωση του.

Τα ανθρώπινα κύτταρα HeLa, διαμολύνθηκαν παροδικά με τα πλασμίδια που φέρουν το cDNA για τα γονίδια του AP2α και της μεταλλαγμένης του μορφής, κλωνοποιημένα στον πλασμιδιακό φορέα pcDNA3.1-HA. Η καλλιέργεια των κυττάρων πριν την επιμόλυνση καταλάμβανε το 70-80% της επιφάνειας του τρυβλίου. Το μίγμα του DNA (15 μg για κάθε πιάτο διαμέτρου 10 cm) προστέθηκε σε 1.5ml θρεπτικό μέσο DMEM απουσία FBS και PS. Το μίγμα αναδεύτηκε και στη συνέχεια προστέθηκαν 30 μg PEI (1μg/μl), αναδεύτηκε ξανά και επώαστηκε για 10 λεπτά, ώστε να ολοκληρωθεί η δημιουργία συμπλόκων του DNA με τον παράγοντα διαμόλυνσης. Ακολούθως προστέθηκαν 4.5ml θρεπτικού μέσου, το οποίο περιείχε 5% FBS) και τέλος το μίγμα προστέθηκε στα κύτταρα από τα οποία είχε αφαιρεθεί το παλιό θρεπτικό υγρό και είχαν ξεπλυθεί με PBS. Τα κύτταρα επώαστηκαν με τον παράγοντα διαμόλυνσης για 4 ώρες. Τα κύτταρα επώαστηκαν σε φρέσκο θρεπτικό υλικό (10% FBS + PS) για 24-48 ώρες πριν ελεγχθεί η έκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης που κωδικοποιεί το πλασμίδιο.

4.14 Παρασκευή πρωτεϊνικού κυτταρικού εκχυλίσματος

Τα κύτταρα αρχικά ξεπλύθηκαν με 5 ml PBS + 20mM NEM. Το NEM (N-ethylmaleimide) είναι μια ένωση η οποία μπορεί να αντιδράσει με θειολικές ομάδες και έτσι δεσμεύεται σε κατάλοιπα κυστεϊνών, μέσω σχηματισμού ισχυρού μη αντιστρεπτού C-S δεσμού. Στα πειράματα της παρούσας εργασίας χρησιμοποιείται ως αναστολέας αυτοκτονίας για να απενεργοποιήσει τις SUMO-ισοπεπτιδάσες και τα ένζυμα σουμοϋλίωσης, τα οποία φέρουν στο ενεργό τους κέντρο κυστεΐνες. Με αυτόν τον τρόπο αποφεύγεται η σουμοϋλίωση/αποσουμοϋλίωση των πρωτεϊνών κατά τη διαδικασία δημιουργίας του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος.

Στη συνέχεια προστέθηκε κατευθείαν στο τρυβλίο διάλυμα λύσης 2x SDS +DTT (50mM Tris pH 6.8, 2% SDS, 0,1% Bromophenol blue, 10% glycerol, 100mM DTT) προκειμένου να γίνει ρήξη των μεμβρανών και να παραληφθεί το διαλυτό πρωτεϊνικό κλάσμα σε αποδιατεταγμένη μορφή. Έπειτα το εκχύλισμα των κυττάρων συλλέγεται από το τρυβλίο με τη βοήθεια ειδικής σπάτουλας. Ακολουθεί επίδραση υπερήχων (20 φορές, 1 sec, 40μΑ amplitude), και θέρμανση των δειγμάτων στους 95°C για 5 λεπτά. Τα δείγματα αποθηκεύονται στους -20°C μέχρι την ημέρα της ανάλυσης τους με ηλεκτροφόρηση.

4.15 Ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός και ανάλυση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου κάτω από μετουσιωτικές συνθήκες (SDS-PAGE)

Η τεχνική αυτή βασίζεται στη δυνατότητα μετακίνησης των φορτισμένων μορίων διαμέσου των πόρων ενός πηκτώματος υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου, κι έτσι προσφέρει έναν αναλυτικό

τρόπο για το διαχωρισμό μακρομορίων. Στην συγκεκριμένη ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται ως αποδιατακτικό μέσο το ανιονικό απορρυπαντικό SDS. Το SDS εκτός του ότι αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες δεσμεύεται πάνω σ' αυτές μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων, και προσδίδει στην πρωτεΐνη έναν αρνητικό «μανδύα», έτσι η ηλεκτροφορητική κινητικότητα των πολυπεπτιδικών αλυσίδων εξαρτάται μόνο από το μοριακό τους βάρος. Έτσι οι μικρές πρωτεΐνες μετακινούνται γρηγορότερα περνώντας πιο εύκολα από τους πόρους της πηκτής, ενώ οι μεγάλες πρωτεΐνες παραμένουν πιο κοντά στο σημείο εκκίνησης.

Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών γίνεται σε πήκτωμα, που λειτουργεί σαν μοριακός ηθμός. Το πήκτωμα ακρυλαμίδης είναι ένα τρισδιάστατο πλέγμα από μακριές αλειφατικές αλυσίδες πολυακρυλαμιδίου και σχηματίζεται από τον πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$) και του N,N μεθυλενοδισακρυλαμιδίου ή bis-ακρυλαμιδίου ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}-\text{CH}_2$) που συνδέει τις αλυσίδες του πρώτου. Με τον τρόπο αυτό δημιουργείται ένα πολυμερές πλέγμα που διαθέτει πόρους που το μέγεθος τους εξαρτάται από το βαθμό πολυμερισμού ανάλογα και με τη συγκέντρωση των μονομερών στο διάλυμα. Η δημιουργία του πλέγματος γίνεται μέσω του μηχανισμού των ελευθέρων ριζών με την προσθήκη του υπερθεϊκού αμμωνίου $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ (APS) για την έναρξη του μηχανισμού και του φωτοχημικού καταλύτη τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνη (TEMED) για τη διάδοση του.

- Προετοιμασία της πηκτής πολυακρυλαμιδίου

Η πηκτή πολυακρυλαμιδίου αποτελείται από δύο μέρη, το πήκτωμα διαχωρισμού – separating gel (7,5 cm ύψος, 1mm πάχος) και το πήκτωμα επιστοίβαξης – sticking gel (1 cm ύψος). Οι θέσεις εισαγωγής δημιουργήθηκαν με τη βοήθεια πλαστικής οδοντωτής μήτρας η οποία αφαιρέθηκε μετά τον πολυμερισμό της πηκτής.

Για την παρασκευή της πηκτής για την SDS-PAGE χρησιμοποιήθηκαν οι συσκευές της BIO-RAD. Ανάμεσα στις πλάκες της ηλεκτροφόρησης προστέθηκαν πρώτα 5ml πηκτής διαχωρισμού 10% (Acrylamide 10%, Lower buffer 1x, APS 0,04%, TEMED 1:500, H_2O /pH 8,8) (Lower Buffer 4x: 1.5M Tris, 8mM EDTA, 0,4% SDS), και στη συνέχεια παρασκευάστηκαν 4ml πηκτής επιστοίβαξης (Acrylamide 4,5%, Upper Buffer 1x, H_2O , APS 0,0625%, TEMED 1: 333, H_2O /pH 6.8) (Upper Buffer 4x: 0.5 M Tris, 8mM EDTA, 0,4% SDS).

Όλη η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης έγινε μέσα σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running Buffer: 0.25M Tris, 1.92M γλυκίνη, 0.5% SDS). Τα δείγματα, πριν εισαχθούν στο πήκτωμα επιστοίβαξης θερμάνθηκαν για 5 λεπτά στους 97°C , ώστε οι πρωτεΐνες να αποδιαταχθούν πλήρως και να διευκολυνθεί η δημιουργία συμπλόκων SDS-πρωτεΐνης. Συγκεκριμένα, 40μl δείγματος (20-50μgρ ολικής πρωτεΐνης) φορτώθηκαν στις θέσεις εισαγωγής δείγματος της πηκτής επιστοίβαξης, καθώς επίσης και μάρτυρας αποτελούμενος από πρωτεΐνες γνωστών μοριακών βαρών. Η ηλεκτροφόρηση έγινε κάτω από σταθερή ένταση ρεύματος 120 V για 1 ώρα.

4.16 Αποτύπωση και ανοσοανίχνευση πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Western Blotting)

Η τεχνική αυτή αποτελείται από δύο μέρη. Το πρώτο μέρος είναι η ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών σε μια μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, χρησιμοποιώντας την ημίξηρη μέθοδο (Semi-dry transfer). Το δεύτερο μέρος είναι η ανοσοανίχνευση που επιτρέπει τον εντοπισμό μιας καθηλωμένης σε μεμβράνη πρωτεΐνης με τη βοήθεια ειδικών αντισωμάτων.

- **Μεταφορά ημίξηρης φάσης**

Η ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών βασίζεται στην κίνηση των πρωτεϊνών, που βρίσκονται υπό τη μορφή συμπλόκου με το SDS και είναι αρνητικά φορτισμένες, από την πηκτή προς τη μεμβράνη κατά την εφαρμογή διαφοράς δυναμικού. Η μεταφορά επιτυγχάνεται μέσα σε σχεδόν υγρό περιβάλλον με ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (Transfer Buffer: 125mM Tris-Borate pH 8.5, 0,2% SDS, 0,5mM DTT).

Στη συσκευή ηλεκτρομεταφοράς τοποθετήθηκαν διαδοχικά 2 χαρτιά Whatman, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, η πηκτή και τέλος άλλα 2 χαρτιά Whatman, όλα εμποτισμένα σε διάλυμα μεταφοράς. Οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν σε συνθήκες 10 V για 75 λεπτά. Η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε ήταν το μοντέλο TRANS-BLOT SD Semi-Dry Transfer Cell της εταιρίας BIO-RAD.

Στο τέλος της ηλεκτρομεταφοράς, η μεμβράνη βάφτηκε με τη χρωστική Ponceau S., προκειμένου να ελεγχθεί η επιτυχία της μεταφοράς των πρωτεϊνών. Σημειώθηκαν οι ζώνες του μάρτυρα, και η μεμβράνη αποχρωματίστηκε με διάλυμα 1x PBS – 0.1% Tween20.

- **Ανοσοανίχνευση**

Ακολούθησε επώαση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης σε διάλυμα κορεσμού (5% γάλα σε σκόνη, PBS-0,1% Tween20) για 1 ώρα, με σκοπό τον κορεσμό των θέσεων δέσμευσης πρωτεϊνών της μεμβράνης από τις πρωτεΐνες γάλακτος, ώστε να αποφευχθούν οι μη εξειδικευμένες αλληλεπιδράσεις του αντισώματος με τη μεμβράνη. Έπειτα έγινε ολονύκτια επώαση με το εκάστοτε πρώτο αντίσωμα σε κατάλληλη αραίωση σε 5% γάλα-PBS-0,1% Tween20 υπό συνεχή ανάδευση στους 4°C. Ακολούθησε ξέπλυμα 3 φορές από 10 λεπτά με PBS-Tween20. Μετα έγινε επώαση με κατάλληλο δεύτερο αντίσωμα (επίσης αραιωμένο σε 5% γάλα-PBS-Tween20), το οποίο είναι συζευγμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση (HorseRadish Peroxidase, HRP) και αναγνωρίζει και προσδένεται στο πρώτο αντίσωμα. Το δεύτερο αντίσωμα χρησιμοποιείται σε κατάλληλη αραίωση για 1 ώρα υπο συνεχή ανάδευση και τέλος ξεπλύθηκε 3 φορές με PBS-Tween20.

Για την ανίχνευση των πρωτεϊνών ενδιαφέροντος χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της χημειοφωταύγειας. κατά την οποία η υπεροξειδάση του 2ου αντισώματος καταλύει σε αλκαλικό

περιβάλλον την οξείδωση της λουμινόλης κάτω από την επίδραση του H₂O₂ με ταυτόχρονη εκπομπή φωτονίων.

Η αντίδραση επιτυγχάνεται με την προσθήκη 30 μl H₂O₂ και 100 μl κουμαρικού οξέος (6.8 mM κουμαρικού οξέος σε DMSO) σε 10ml διαλύματος λουμινόλης (1.25 mM λουμινόλης σε Tris-Cl pH 8.5) για 1-2 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Για τη λήψη και την επεξεργασία των φωτογραφιών της μεμβράνης χρησιμοποιήθηκε το software Alliance 7 της UVITEC.

4.17 Ανοσοκατακρήμνιση

Με την τεχνική της ανοσοκατακρήμνισης είναι δυνατή η απομόνωση μιας πρωτεΐνης μέσω καθήλωσής της σε στερεή φάση με τη βοήθεια ειδικού αντισώματος και στη συνέχεια η έκλουση της από αυτή. Ως στερεή φάση χρησιμοποιούνται σφαιρίδια από σεφαρόζη. Πάνω στα σφαιρίδια βρίσκεται ομοιοπολικά δεσμευμένη πρωτεΐνη A (πρωτεΐνη βακτηριακής προέλευσης που δεσμεύει με μεγάλη συγγένεια την Fc περιοχή των IgG ανοσοσφαιρινών). Με τη χρήση της δημιουργείται ένα σύμπλοκο σφαιριδίων-πρωτεΐνης A-αντισωμάτων στο οποίο δεσμεύεται επιλεκτικά το αντιγόνο που θέλουμε να κατακρημνιστεί. Οι πρωτεΐνες που προσδέθηκαν ειδικά στο σύμπλοκο μπορούν να αποδεσμευτούν με τη χρήση αποδιατακτικών παραγόντων. Στη συγκεκριμένη εργασία ακολουθήθηκε πρωτόκολλο ανοσοκατακρήμνισης (38) που αναπτύχθηκε στο εργαστήριο της F.Melchior (ZMBH, Πανεπιστήμιο Χαϊδελβέργης Γερμανία) προκειμένου να μελετηθούν ενδογενείς σουμοϋλιωμένες μορφές πρωτεϊνών. Οι σουμοϋλιωμένες πρωτεΐνες είναι σε πολύ μικρή ποσότητα εντός του κυττάρου, γιατί ανά πάσα στιγμή περίπου το 1% των πρωτεϊνών είναι σουμοϋλιωμένο και επιπλέον, κατά τη διάρκεια λύσης των κυττάρων είναι εύκολο να χαθεί η ομοιοπολική σύνδεση με SUMO εξαιτίας των πολύ δραστικών SUMO πεπτιδασών.

Αρχικά παρασκευάστηκαν ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα ως εξής: σε διαμολυσμένα κύτταρα που εκφράζουν τις HA-AP-2a wt και HA-AP2a-mut απομακρύνθηκε το θρεπτικό υλικό και τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με PBS +20mM NEM, το οποίο και απομακρύνθηκε τελείως, έπειτα προστέθηκαν 150μl 2x RIPA lysis buffer (2x lysis buffer: 1x PBS, 2% SDS, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 2μl PMSF, 2 μl AP, 2μl LP, 0,1M NEM). Τα κύτταρα αποκολλήθηκαν από το τρυβλίο με τη βοήθεια ειδικής σπάτουλας και το εκχύλισμα συλλέχθηκε και αποθηκεύτηκε στους -80°C μέχρι την ημέρα της ανοσοκατακρήμνισης.

Την ημέρα της ανοσοκατακρήμνισης έγινε γρήγορο ξεπάγωμα των εκχυλισμάτων σε ζεστό υδατόλουτρο, στη συνέχεια τα εκχυλίσματα υπάστησαν επεξεργασία με υπέρηχους (50 duty cycles, 20 φορές) κατεργασία με DTT (Dithiothreitol) έως ότου η τελική συγκέντρωσή του να είναι 50mM, και βρασμό για 10 λεπτά. Στο επόμενο βήμα προστέθηκε RIPA Buffer (w/o SDS + PI) (RIPA Buffer w/o SDS + PI: 20 mM Na-phosphate buffer (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1% Triton-X-100, 0.5% Na-deoxycholate) τόσο ώστε η τελική συγκέντρωση του SDS να είναι 0,1%, καθώς και

20mM NEM για την απενεργοποίηση του DTT. Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα φιλτραρίστηκαν με τη βοήθεια φίλτρου 0,45μM pore filter. Στο υπόλοιπο διήθημα έγινε μέτρηση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford. Σε αυτή τη μέθοδο χρησιμοποιείται χρωστική Coomassie Brilliant Blue G250 που προστίθεται σε συγκέντρωση 1 mg/ml, σε 200 ml διαλύματος φωσφορικού οξέως 85% υπό ανάδευση και το διάλυμα που προκύπτει αραιώνεται με νερό στο 1 lt. Μετά την ανάμιξη του πρωτεϊνικού δείγματος και του αντιδραστηρίου, το σχηματιζόμενο σύμπλοκο απορροφά στα 595 nm. Η απορρόφηση αυτή ανάγεται σε συγκέντρωση πρωτεΐνης χρησιμοποιώντας την πρότυπη καμπύλη αναφοράς με αλβουμίνη (BSA), έτσι ώστε να προσδιοριστεί η περιεκτικότητα του δείγματος σε πρωτεΐνη.

Υπολογίστηκε η ποσότητα των πρωτεϊνών και προστέθηκε η κατάλληλη ποσότητα σφαιριδίων συζευγμένων με HA αντίσωμα (HA-beads, INVITROGEN), (για 1μg πρωτεϊνών χρειάζονται 10 μl σφαιρίδια). Ακολούθησε η ανοσοκατακρήμνιση με ολονύχτια επώαση σε συνεχή ανάδευση στους 4°C. Την επόμενη μέρα τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν ήπια στα 700g ώστε να κατακρημνιστούν τα σφαιρίδια τα οποία φέρουν την HA-AP2a wt /mut. Τα σφαιρίδια ξεπλύθηκαν με RIPA Buffer (0,1% SDS, +NEM, +PI: RIPA Buffer, 0.1% SDS, 5 mM EDTA, 5mM EGTA, 5 μl AP, 5 μl LP, 10mM NEM), φυγοκεντρήθηκαν για τρεις φορές. Στο τέλος έγινε έκλυση των πρωτεϊνών από τα σφαιρίδια με 45μl 2x SDS (w/o DTT) το μίγμα αφέθηκε να επωαστεί για 5 λεπτά στους 37°C, αναδεύοντας κατά διαστήματα, και στη συνέχεια τα σφαιρίδια κατακρημνίστηκαν με φυγοκέντρηση. Το εκλούσμα απομακρύνθηκε με προσοχή (χωρίς σφαιρίδια) και τέλος προστέθηκε σε αυτό 100mM DTT. Κατά τη διάρκεια του πειράματος ελήφθησαν δείγματα από το ολικό εκχύλισμα κυττάρων (input), από το μη δεσμευμένο στα σφαιρίδια κλάσμα του εκχυλίσματος (flow-through) μετά την ανοσοκατακρήμνιση και από το τελικό έκλουσμα (eluate). Σε αυτά προστέθηκε 4x Sample buffer και επωάστηκαν στους 95°C για 5 λεπτά, αποθηκεύτηκαν στους -20°C μέχρι τη μέρα της ηλεκτροφόρησης (Sample Buffer 1X: 50mM Tris pH 6.8, 2% SDS, 0,1% Bromophenol blue, 10% Glycerol)

4.18 Εμμεσος ανοσοφθορισμός

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την ανίχνευση πρωτεϊνών σε κύτταρα καλλιέργειας με χρήση αντισωμάτων που φέρουν φθορίζουσες ομάδες. Ο ανοσοφθορισμός βασίζεται στην αλληλεπίδραση των κατάλληλων αντισωμάτων με τα αντίστοιχα αντιγόνα τους που βρίσκονται στις διάφορες υποκυτταρικές περιοχές των κυττάρων. Περαιτέρω επεξεργασία με δεύτερα αντισώματα, τα οποία φέρουν συζευγμένες φθορίζουσες ομάδες επιτρέπει τον φθορισμό του ανοσοσυμπλόκου πρωτεΐνης-αντισωμάτων και τον εντοπισμό των πρωτεϊνών στα κύτταρα με τη χρήση μικροσκοπίου το οποίο φέρει κατάλληλους φακούς και φίλτρα απορρόφησης του φωτός.

Αναλυτικότερα η διαδικασία που ακολουθήθηκε στην παρούσα εργασία ήταν η εξής. Τα κύτταρα αρχικά αφέθηκαν να αναπτυχθούν για 24 ώρες και να προσκολληθούν πάνω σε καλυπτρίδες. Κατόπιν υπέστησαν παροδική διαμόλυνση με τον τρόπο που αναφέρθηκε προηγουμένως και στη συνέχεια αφέθηκαν άλλες 24 ώρες να αναπτυχθούν. Στη συνέχεια τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με PBS και μονιμοποιήθηκαν με διάλυμα φορμαλδεΰδης 3.7% σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 5 λεπτά, οι καλυπτρίδες ξεπλύθηκαν πάλι με PBS. Επόμενο βήμα ήταν η δημιουργία διαπερατών μεμβρανών με την προσθήκη 1% Triton X-100 για 5 λεπτά στους 4°C. Τα κύτταρα ξεπλύθηκαν δυο φορές με διάλυμα 1xPBS – 0.1% Tween20 και κατόπιν κορέστηκαν οι μη ειδικές θέσεις αλληλεπίδρασης με τα αντισώματα με 3% BSA σε 1x PBS – 0.1% Tween20 για 1 ώρα. Στη συνέχεια τα κύτταρα επώαστηκαν με τα πρώτα αντισώματα για 2 ώρες σε ειδικά διαμορφωμένο θάλαμο με αυξημένη υγρασία. Ακολούθησαν τρεις πλύσεις με 1% BSA σε 1xPBS– 0.1% Tween20 και μετά επώαστηκαν με τα δεύτερα αντισώματα που αναγνωρίζουν ανοσοσφαιρίνες κουνελιού ή ποντικού και φέρουν φθορίζουσες ομάδες τύπου Alexa fluor 488-564 κλπ. Εγινε επώαση για 1 ώρα. Τα κύτταρα ξεπλύθηκαν τρεις φορές με διάλυμα 1% BSA σε 1xPBS– 0.1% Tween20, μία φορά σε 1x PBS και μία φορά σε νερό για να απομακρυνθούν τυχόν άλατα. Κατόπιν οι καλυπτρίδες μεταφέρθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες με διάλυμα μονιμοποίησης MOWIOL (Sigma) που περιέχει τη χρωστική ουσία DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride) η οποία δεσμεύεται στη χρωματίνη (για τη χρώση του πυρήνα των κυττάρων). Τέλος έγινε η παρατήρησή τους στο μικροσκόπιο φθορισμού και λήψη των φωτογραφιών με χρήση του λογισμικού ZEISS. Οι φωτογραφίες επεξεργάστηκαν με το πρόγραμμα FIJI-Image J.

5 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

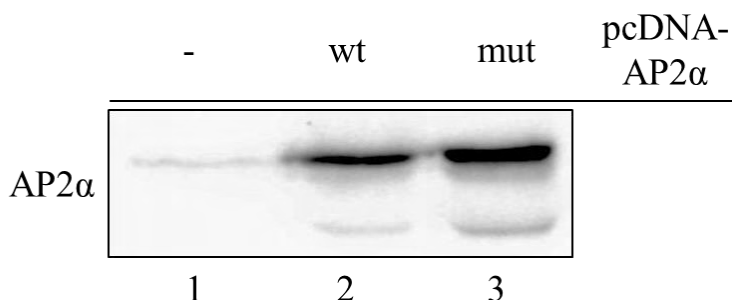
5.1 Έλεγχος των πλασμιδιακών κατασκευών pcDNA3.1-AP2α wt & pcDNA3.1-AP2α mut

Από αποτελέσματα προκαταρκτικών πειραμάτων ποσοτικής ανάλυσης σουμουλιωμένων πρωτεϊνών που έγιναν σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας (SILAC) (αδημοσίευτα δεδομένα, *Εισαγωγή 1.2.7*) ανάμεσα στις πρωτεΐνες που έδειξαν να αλλάζουν τα επίπεδα σουμουλίωσης τους (περίπου 1,5 φορές), ήταν και ο μεταγραφικός παράγοντας AP2α (Transcriptional Factor AP2α, TFAP2α), ο οποίος είναι ένας ιδιαίτερος μεταγραφικός παράγοντας που πιθανά εμπλέκεται στο μονοάτι της υποξίας (*Εισαγωγή 1.3.2*). Προμηθευτήκαμε το πλασμίδιο pcDNA3.1-AP2α wt (*Υλικά 3.6.1*) από το εργαστήριο του S.Bhattacharya (University of Oxford) το οποίο φέρει το cDNA για την ανθρώπινη πρωτεΐνη TFAP2α. Το πλασμίδιο pcDNA3.1-AP2α mut τροποποιήθηκε από το αρχικό πλασμίδιο pcDNA3.1-AP2α wt με στοχευμένη μεταλλαξιγένεση από την Δρ Χαχάμη Γεωργία, (Εργαστήριο Βιοχημείας, Ιατρική Λάρισας) και φέρει μετάλλαξη στο cDNA του TFAP2α ώστε η πρωτεΐνη που προκύπτει να φέρει αλλαγή ενός αμινοξέος (λυσίνη σε αργινίνη, K10R) και να χάνει την ικανότητα σουμουλίωσης. Τα πλασμίδια αυτά χρησιμοποιήθηκαν παρακάτω ως εκμαγεία για τις κλωνοποιήσεις.

5.1.1 Έλεγχος της έκφρασης και του υποκυττάριου εντοπισμού των υπερέκφρασμένων AP2α wt και AP2α mut σε κύτταρα HeLa.

Με σκοπό να ελέγξουμε τις παραπάνω πλασμιδιακές κατασκευές και να επιβεβαιώσουμε ότι η πρωτεΐνη καθώς και το μετάλλαγμα της είναι λειτουργικά, εκφράζονται και συμπεριφέρονται με τον αναμενόμενο τρόπο προχωρήσαμε σε πειράματα υπερέκφρασης και ανοσοφθορισμού.

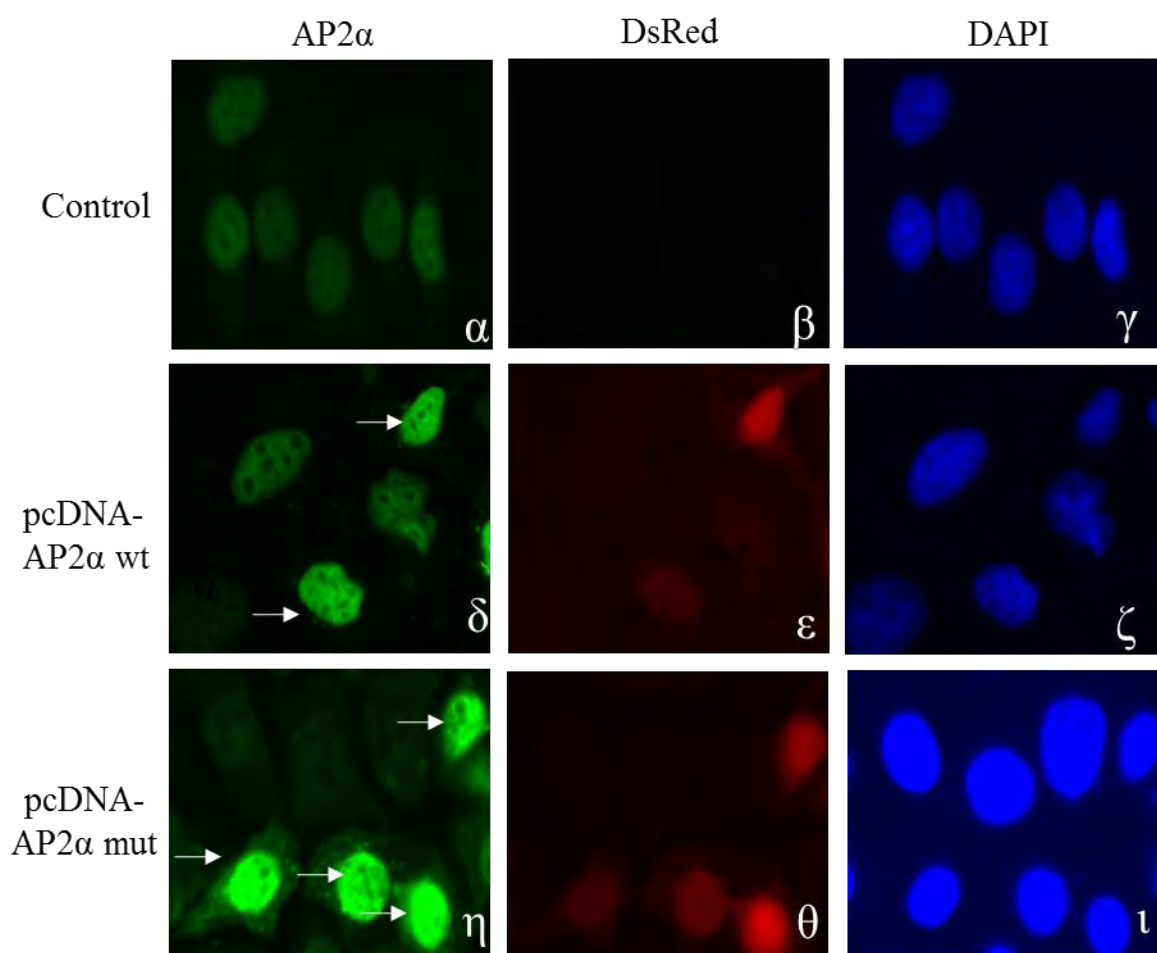
Αρχικά έγινε παροδική διαμόλυνση κυττάρων HeLa με τα πλασμίδια pcDNA-AP2α wt & pcDNA-AP2α mut. Μετά από 24 ώρες έγινε συλλογή και λύση των κυττάρων. Η έκφραση ελέγχθηκε ποιοτικά με ανοσοαποτύπωση κατά Western (*Μέθοδοι 4.16*).



Εικόνα 14: Έλεγχος της υπερέκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα AP2α wt και AP2α mut σε κύτταρα HeLa. Τα κύτταρα επωάστηκαν με: pcDNA-AP2α wt (Διαδρομή 2), pcDNA-AP2α mut (Διαδρομή 3), στη Διαδρομή 1 τα κύτταρα δεν επωάστηκαν με εξωγενές DNA. Τα κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιώντας αντίσωμα έναντι του AP2α.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα (Εικόνα 14) οι υπερεκφρασμένοι AP2α wt και AP2α mut εκφράζονται το ίδιο και στο αναμενόμενο μέγεθος 52kDa. Επιπλέον φαίνεται ότι η έκφρασή τους είναι πολύ μεγαλύτερη από τον ενδογενή AP2α ο οποίος φαίνεται στη Διαδρομή 1.

Ο εντοπισμός της θέσης των δυο μορφών του AP2α μέσα στο κύτταρο έγινε με έμμεσο ανοσοφθορισμό. Κύτταρα HeLa διαμολύνθηκαν με πλασμιδιακό DNA: pcDNA-AP2α wt, pcDNA-AP2α mut και pDsRed. Το πλασμίδιο DsRed φέρει το cDNA που κωδικοποιεί την κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (Υλικά 3.6.3) και χρησιμοποιείται σαν δείκτης αναφοράς για την αποτελεσματικότητα της διαμόλυνσης. Κύτταρα που διαμολύνθηκαν και προσέλαβαν το εξωγενές DNA θα εκφράσουν και την κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη, άρα είναι ένας τρόπος για να διακρίνουμε τα κύτταρα που εκφράζουν τον ενδογενή (μη έκφραση κόκκινης φθορίζουσας πρωτεΐνης), από τα κύτταρα που εκφράζουν τον εξωγενή AP2α (έκφραση κόκκινης φθορίζουσας πρωτεΐνης). Τα αποτελέσματα του υποκυττάριου εντοπισμού παρουσιάζονται παρακάτω (Εικόνα 15)



Εικόνα 15: Έλεγχος υποκυτταρικού εντοπισμού του ενδογενούς και υπερεκφρασμένου μεταγραφικού παράγοντα AP2α wt και AP2α mut σε κύτταρα HeLa με χρήση αντισώματος έναντι του AP2α. Τα κύτταρα διαμολύνθηκαν με pcDNA-AP2α wt & DsRed (δ, ε, ζ), με pcDNA-AP2α mut & DsRed (η, θ, ι), ενώ η σειρά α,

β, γ αποτελεί το control (δεν διαμολύνθηκαν με εξωγενές DNA). Με βέλη σημειώνονται τα κύτταρα που έχουν προσλάβει το εξωγενές DNA. Στις εικόνες γ,ζ,η φαίνονται οι πυρήνες των κυττάρων μετά απο χρώση με τη χρωστική DAPI.

Αρχικά παρατηρούμε ότι ο AP2α wt (δ βέλη), ο AP2α mut (η βέλη) καθώς και ο ενδογενής (α) εντοπίζονται στον πυρήνα των κυττάρων. Τα κύτταρα που εκφράζουν τον εξωγενή AP2α δίνουν πολύ εντονότερο σήμα, ενώ δεν εντοπίζονται διαφορές στον κυτταρικό εντοπισμό μεταξύ του AP2α wt και του AP2α mut που όπως αναφέρθηκε ήδη, έχει χάσει την ικανότητα σουμοϋλίωσης

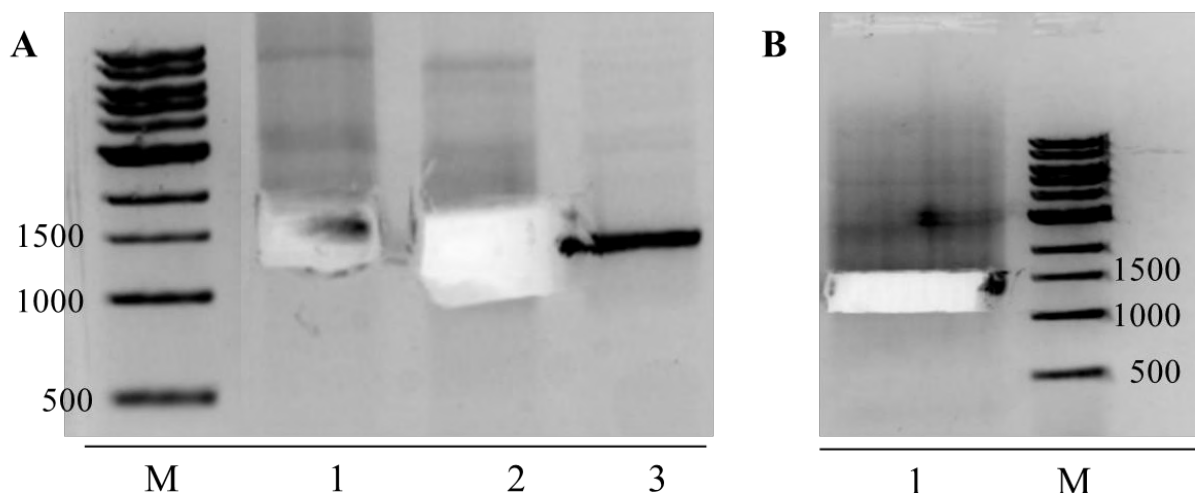
Συνολικά τα αποτελέσματα του ανοσοφθορισμού συμφωνούν με αυτά της ανοσοαποτύπωσης και δείχνουν πως η υπερεκφρασμένη πρωτεΐνη εκφράζεται χωρίς πρόβλημα στο σωστό μέγεθος και υποκυτταρικό διαμέρισμα. Επομένως, έχοντας ελέγξει τις κατασκευές που είχαμε, προχωρήσαμε σε πειράματα κλωνοποίησης. Επιπλέον, είναι η πρώτη φορά που χρησιμοποιήθηκε το συγκεκριμένο αντίσωμα έναντι του AP2α (Υλικά 3.8) με αρκετά ικανοποιητικά αποτελέσματα τόσο σε ανοσοφθορισμό όσο και ανοσοαποτύπωση.

5.2 Κλωνοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα AP2α-wt & AP2α-mut σε πλασμιδιακό φορέα pcDNA3.1-HA.

Κύριο μέρος της εργασίας αποτέλεσε η κλωνοποίηση των δυο μορφών του μεταγραφικού παράγοντα AP2α σε πλασμιδιακό φορέα που φέρει σαν αλληλουχία σύντηξης με τις πρωτεΐνες τον επίτοπο HA στο αμινοτελικό άκρο της ανασυνδιασμένης πρωτεΐνης. Πρόκειται για το πεπτίδιο (YPYDVPDYA) της πρωτεΐνης HA (Human influenza HemAgglutinin). Με τις κατασκευές αυτές θα δοθεί περαιτέρω η δυνατότητα να προχωρήσουμε σε πειράματα υπερέκφρασης και ανοσοανίχνευσης, ανοσοφθορισμού καθώς και ανοσοκατακρήμνισης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης, ενώ θα μπορούμε να διακρίνουμε τον ενδογενή AP2α απο τον υπερεκφρασμένο HA-AP2α χρησιμοποιώντας αντίσωμα έναντι του επίτοπου HA.

5.2.1 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR).

Έγινε ενίσχυση της επιθυμητής αλληλουχίας DNA που κωδικοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα AP2α wt και AP2α mut με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, PCR, χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο τα πλασμίδια pcDNA-AP2α wt και pcDNA-AP2α mut αντίστοιχα. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν (Υλικά 3.7) φέρουν αλληλουχίες αναγνώρισης απο περιοριστικά ένζυμα με σκοπό να δώσουν τα επιθυμητά άκρα στο προϊόν της PCR. Μετά από πολλές προσπάθειες, καταλήξαμε στις βέλτιστες συνθήκες για την PCR (Μεθοδοι 4.2) Ανάλυση του προϊόντος της PCR έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1% (Εικόνα 16).



Εικόνα 16 Α) Φωτογραφία απο πηκτή αгарόζης όπου ηλεκτροφορήθηκαν τα προϊόντα της PCR και αφορούν την ενίσχυση του AP2a wt. Στη διαδρομή M είναι ο μάρτυρας που δείχνει τα μοριακά βάρη (1 Kb-DNA ladder NEB), οι διαδρομές 1 και 2 αντιστοιχούν στα προϊόντα της PCR (κενή φαίνεται η περιοχή απο όπου τα κύρια προϊόντα DNA,αποκόπηκαν για περαιτέρω επεξεργασία) στη διαδρομή 3 είναι ένα κλάσμα της PCR που δείχνει το μέγεθος του PCR προϊόντος κοντά στα 1330bp . Β) Φωτογραφία απο πηκτή αгарόζης όπου ηλεκτροφορήθηκαν τα προϊόντα της PCR και αφορούν την ενίσχυση του AP2a mut. Η διαδρομή 1 αντιστοιχεί στα προϊόντα της PCR (κενή φαίνεται η περιοχή απο όπου το κύριο προϊόν DNA,αποκόπηκε για περαιτέρω επεξεργασία). Η διαδρομή M αντιστοιχεί στον μάρτυρα (1 Kb-DNA ladder, NEB).

Η ηλεκτροφόρηση (Εικόνα 16, Διαδρομή 3) έδειξε ένα κύριο προϊόν της PCR το οποίο είναι μεταξύ των 1000 και 1500 ζευγών βάσεων, κοντά δηλαδή στο αναμενόμενο μέγεθος του τμήματος του cDNA του AP-2a (1330bp). Οι ζώνες αυτές τόσο για τον wt όσο και για τον mut αφαιρέθηκαν απο την πηκτή και τα προϊόντα της PCR υποβλήθηκαν σε καθαρισμό με τη βοήθεια του PCR clean kit της εταιρίας Qiagen (Μεθοδοι 4.4).

5.2.2 Πέψη των DNA με περιοριστικά ένζυμα και αντίδραση λιγάσης.

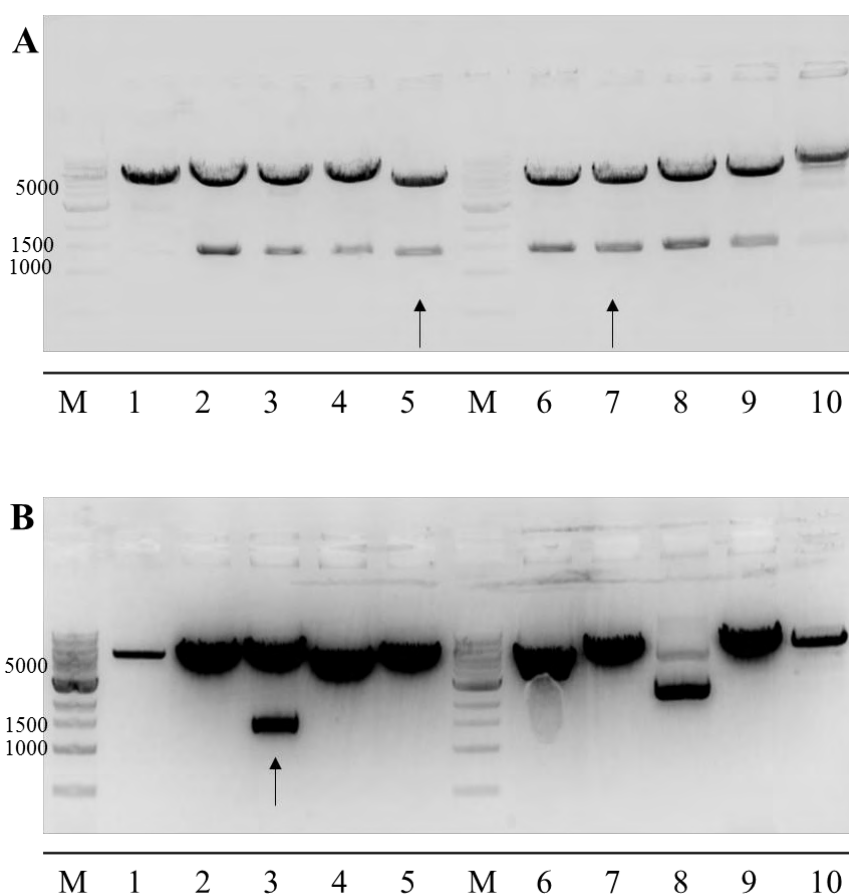
Το επόμενο βήμα περιελάμβανε την δημιουργία κατάλληλων άκρων τόσο στο απομονωμένο ένθεμά μας όσο και στον φορέα κλωνοποίησης pcDNA3.1-HA (Υλικά 3.6.2). Για αυτό, το προϊόν της PCR καθώς και ο φορέας κλωνοποίησης επωάστηκαν με τα ίδια περιοριστικά ένζυμα EcoRI HF και XhoI. Προκειμένου να γίνει σωστή σύνδεση του ενθέματος με τον φορέα κλωνοποίησης, η αντίδραση λιγάσης έγινε με αναλογία ενθέματος:φορέα 3:1 (Μεθοδοι 4.7).

5.2.3 Μετασηματισμός βακτηρίων E.Coli με τις πλασμιδιακές κατασκευές pcDNA3.1-HA-AP2a wt και pcDNA3.1-HA-AP2a mut & Απομόνωση του πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα.

Στη συνέχεια τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια εισήχθησαν σε κύτταρα E.Coli και ακολούθησε επίστρωση σε τρυβλία LB αγαρ με αμπικιλίνη. Την επόμενη μέρα ελέχθηκαν τα τρυβλία, που

έφεραν διακριτές αποικίες (βακτήρια που έφεραν το πλασμίδιο και άρα ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη). Επιλέχθηκαν μερικές αποικίες για περαιτέρω ανάλυση, εμβολιάστηκαν μικρές καλλιέργειες από τις οποίες στη συνέχεια έγινε απομόνωση DNA με αλκαλική λύση σε μικρή κλίμακα (Μέθοδοι 4.9). Το απομονωμένο πλασμιδιακό DNA επώσθηκε με τα ίδια ένζυμα περιορισμού, που χρησιμοποιήθηκαν για την δημιουργία κατάλληλων άκρων κατά την κλωνοποίηση (EcoRI HF, XhoI). Το προϊόν της πέψης ηλεκτροφορήθηκε σε πηκτή αгарόζης 1%.

Οι αποικίες που έχουν προσλάβει το ένθεμα, μετά την πέψη αναμένεται να δώσουν μια ζώνη στις 1330bp (που αντιστοιχεί στο ένθεμα) και μια ζώνη στις 5400bp (που αντιστοιχεί στον φορέα).



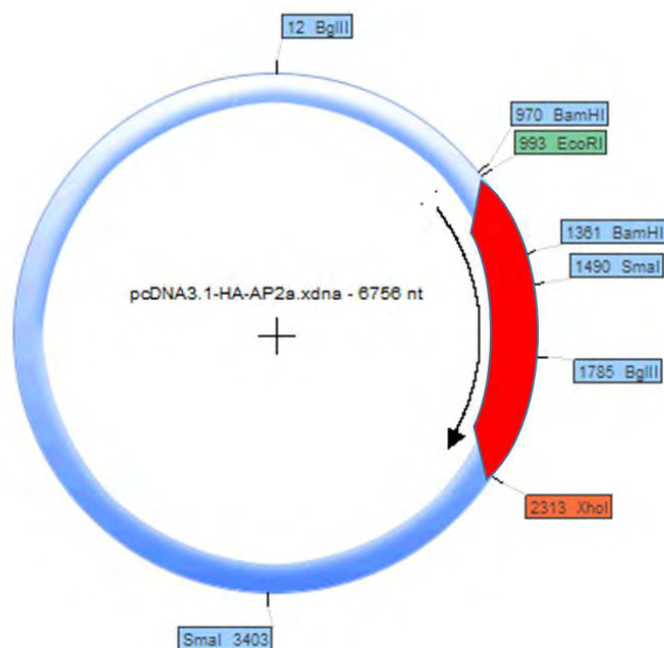
Εικόνα 17: Α) Φωτογραφία από πηκτή αгарόζης που αντιστοιχεί στην πλασμιδιακή κατασκευή pcDNA-HA-AP2a wt. Όπως φαίνεται σχεδόν όλες οι αποικίες είναι θετικές αφού δίνουν ζώνη στα 1330bp που αντιστοιχεί στο ένθεμά μας, από αυτές επιλέχθηκαν οι αποικίες που δείχνουν τα βέλη #5 και #7 για περαιτέρω έλεγχο. Β) Φωτογραφία από πηκτή αгарόζης που αντιστοιχεί στην πλασμιδιακή κατασκευή pcDNA-HA-AP2a mut. Η αποικία που σημειώνεται με το βέλος #3 δίνει την αναμενόμενη ζώνη στα 1330bp και επιλέχθηκε για περαιτέρω έλεγχο. Και στις 2 περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκε μάρτυρας 1Kb DNA ladder (NEB).

Στην Εικόνα 17 Α, που αφορά τον έλεγχο της κατασκευής pcDNA-HA-AP2a wt, βλέπουμε ότι οι διαδρομές 2-9 έδωσαν τις αναμενόμενες ζώνες στα 1330 και 5400bp. Από αυτές επιλέχθηκαν οι αποικίες που αντιστοιχούν στις διαδρομές 5 και 7 ώστε να ελεγχθούν περαιτέρω με περισσότερα

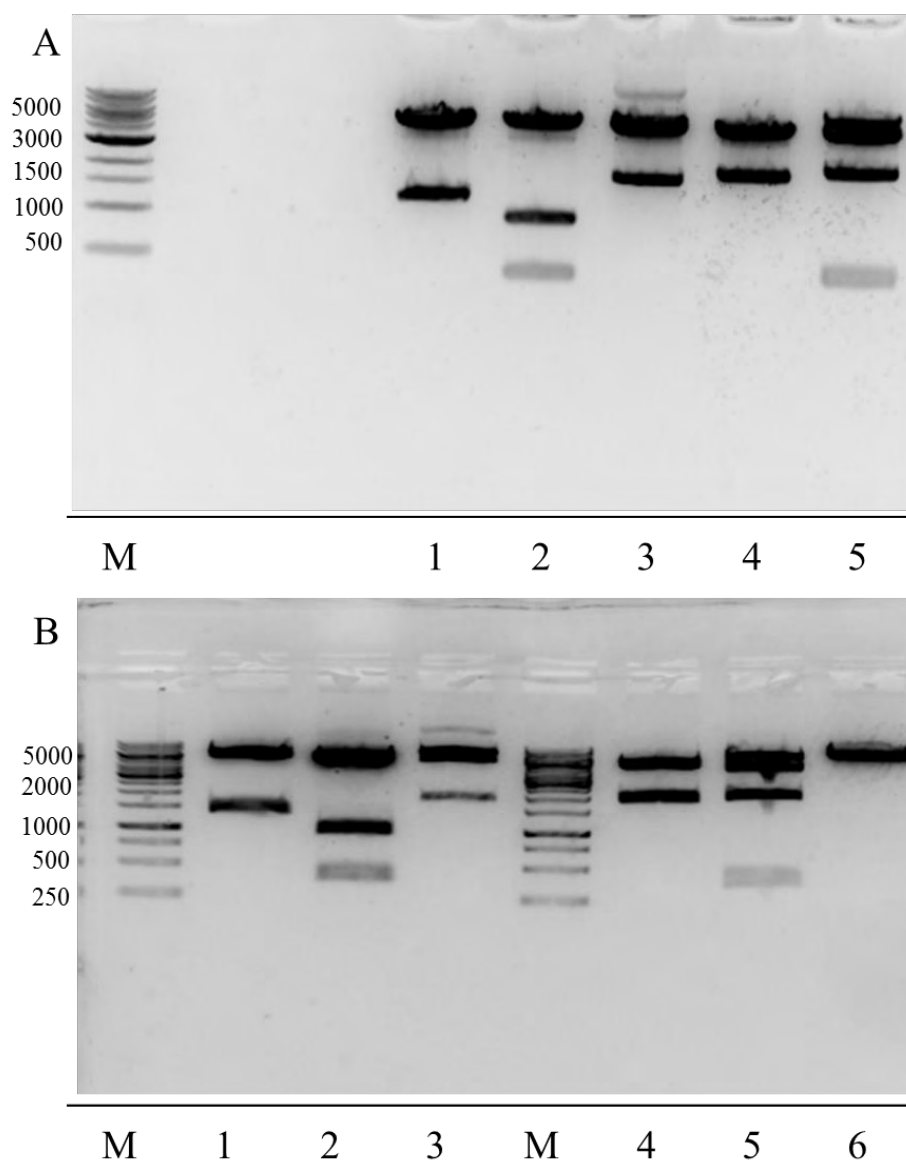
ένζυμα περιορισμού. Στην *Εικόνα 14 B* που αφορά τον έλεγχο της κατασκευής pcDNA-HA-AP2α mut, τις αναμενόμενες ζώνες έδωσε μόνο η διαδρομή 3. Η αποικία αυτή επιλέχθηκε για περαιτέρω ανάλυση με περισσότερα ένζυμα περιορισμού.

5.2.4 Επιβεβαίωση του σωστού ενθέματος με πολλαπλές πέψεις με περιοριστικές ενδονουκλεάσες & Απομόνωση μεσαίας κλίμακας των ανασυνδυασμένων πλασμιδιακών DNA: pcDNA 3.1-HA-AP2α wt και pcDNA 3.1-HA-AP2α mut.

Αφού βρέθηκαν οι μικρές καλλιέργειες που περιέχουν το σωστό πλασμίδιο, ακολούθησε απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας και πέψη αυτή τη φορά με περισσότερα ένζυμα περιορισμού. Στην *Εικόνα 18* φαίνεται ο χάρτης του πλασμιδίου με τις θέσεις των αλληλουχιών αναγνώρισης από τα περιοριστικά ένζυμα. Σύμφωνα με αυτόν: η πέψη του πλασμιδίου με EcoRI και XhoI δίνει δύο θραύσματα με μεγέθη 5.436 και 1.320 bp, η πέψη με BamHI και XhoI δίνει τρία θραύσματα με μεγέθη 5.413, 952 και 391 bp, η πέψη με BglII δίνει δυο θραύσματα με μεγέθη 4.983 και 1.773bp, η πέψη με SmaI δίνει δυο θραύσματα με μεγέθη 4.843 και 1913bp, η πέψη με BamHI και StuI δίνει τρία θραύσματα με μεγέθη 4.347, 2.018 και 391bp. Τέλος, η πέψη μόνο με EcoRI οδηγεί σε γραμμικό φορέα στα 6.756bp.



Εικόνα 18: Χάρτης του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pcDNA3.1-HA-AP2α όπου φαίνονται οι θέσεις των αλληλουχιών αναγνώρισης από τα περιοριστικά ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν. Με κόκκινο χρώμα σημειώνεται τον ένθεμα.



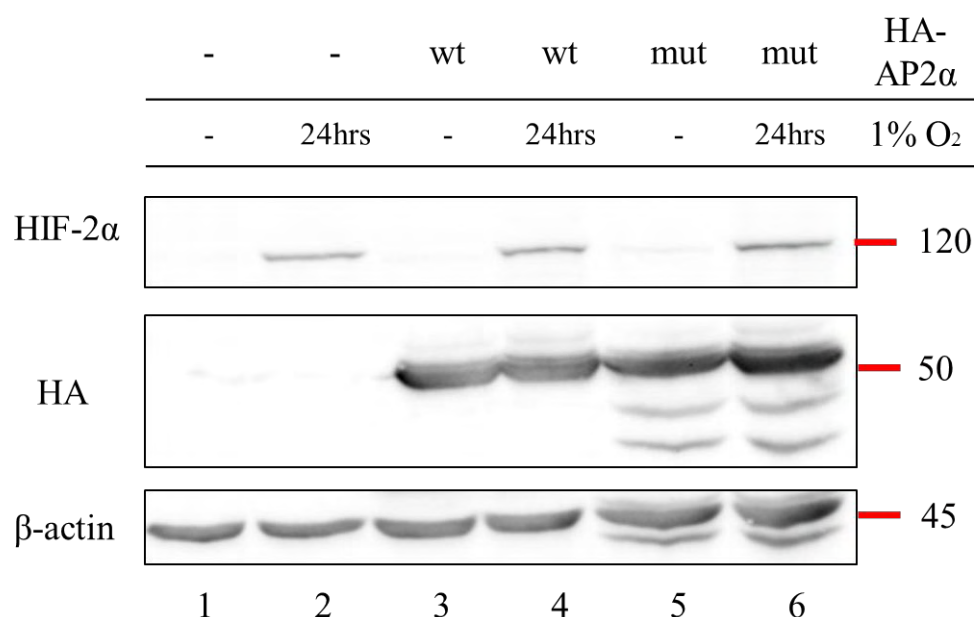
Εικόνα 19: Α) Φωτογραφία από πηκτή αгарόζης που αντιστοιχεί στο *pcDNA-HA-AP2α wt*. Έλεγχος με περιοριστικά ένζυμα, χρησιμοποιήθηκε μάρτυρας *1kb* (NEB) 1: *EcoRI-XhoI*, 2: *BamHI-XhoI* 3: *BglII* 4: *SmaI*, 5: *BamHI-StuI* Β) Φωτογραφία από πηκτή αгарόζης που αντιστοιχεί στο *pcDNA-HA-AP2α mut*. Έλεγχος με περιοριστικά ένζυμα., χρησιμοποιήθηκε μάρτυρας *1kb* (Generuler). 1: *EcoRI-XhoI*, 2: *BamHI-XhoI* 3: *BglII* 4: *SmaI*, 5: *BamHI-StuI* 6: *EcoRI*

Απο την Εικόνα 19 φαίνεται ότι τα πλασμίδια μετά τις πέψεις, έδωσαν τις αναμενόμενες ζώνες και στα αναμενόμενα μεγέθη. Τέλος, τα πλασμίδια ελέγχθησαν και με αλληλούχιση (DNA sequencing) χρησιμοποιώντας εκκινητές που καλύπτουν όλο το ένθεμα του AP-2α, με σκοπό να βρεθούν τυχόν σημειακές μεταλλάξεις που μπορεί να προέκυψαν μετά τη διαδικασία της κλωνοποίησης. Η αλληλούχιση έδειξε πως το ένθεμα τόσο του wt όσο και του mut έχουν κλωνοποιηθεί σωστά και χωρίς να φέρουν άλλες μεταλλάξεις.

5.3 Έλεγχος της έκφρασης και του υποκυττάριου εντοπισμού των HA-AP2α wt και HA-AP2α mut σε κύτταρα HeLa σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας.

Έχοντας πλέον στα χέρια μας τις σωστές κατασκευές pcDNA-HA-AP2α wt και pcDNA-HA-AP2α mut προχωρήσαμε σε πειράματα διαμόλυνσης κυττάρων HeLa προκειμένου να δούμε αν η νέα ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη εκφράζεται και συμπεριφέρεται με τον αναμενόμενο τρόπο. Επίσης τα πειράματα έγιναν και σε συνθήκες υποξίας (1% O₂) για να ελέγξουμε πως επηρεάζεται η έκφραση των πρωτεϊνών, δεδομένου ότι γνωρίζουμε από τα προκαταρκτικά πειράματα πως η υποξία πιθανόν προκαλεί την μεταβολή στη σουμοϋλίωση του AP-2α.

Για αυτό τον σκοπό, κύτταρα HeLa διαμολύνθηκαν με πλασμιδιακό DNA: pcDNA3.1-HA-AP2α wt, pcDNA3.1-HA-AP2α mut, ενώ χρησιμοποιήθηκε ο κενός φορέας pcDNA3.1-HA ως control, ενώ στη συνέχεια επώαστηκαν σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας για 24 ώρες. Τα εκχυλίσματα συλλέχθηκαν και αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα έναντι του HA επίτοπου. Ως μάρτυρας για την επαγωγή της υποξίας χρησιμοποιήθηκε ο HIF-2α, ενώ χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα έναντι της β-ακτίνης για να ελέγξουμε εάν φορτώθηκε ίση ποσότητα πρωτεΐνης στην διαδικασία της ηλεκτροφόρησης.

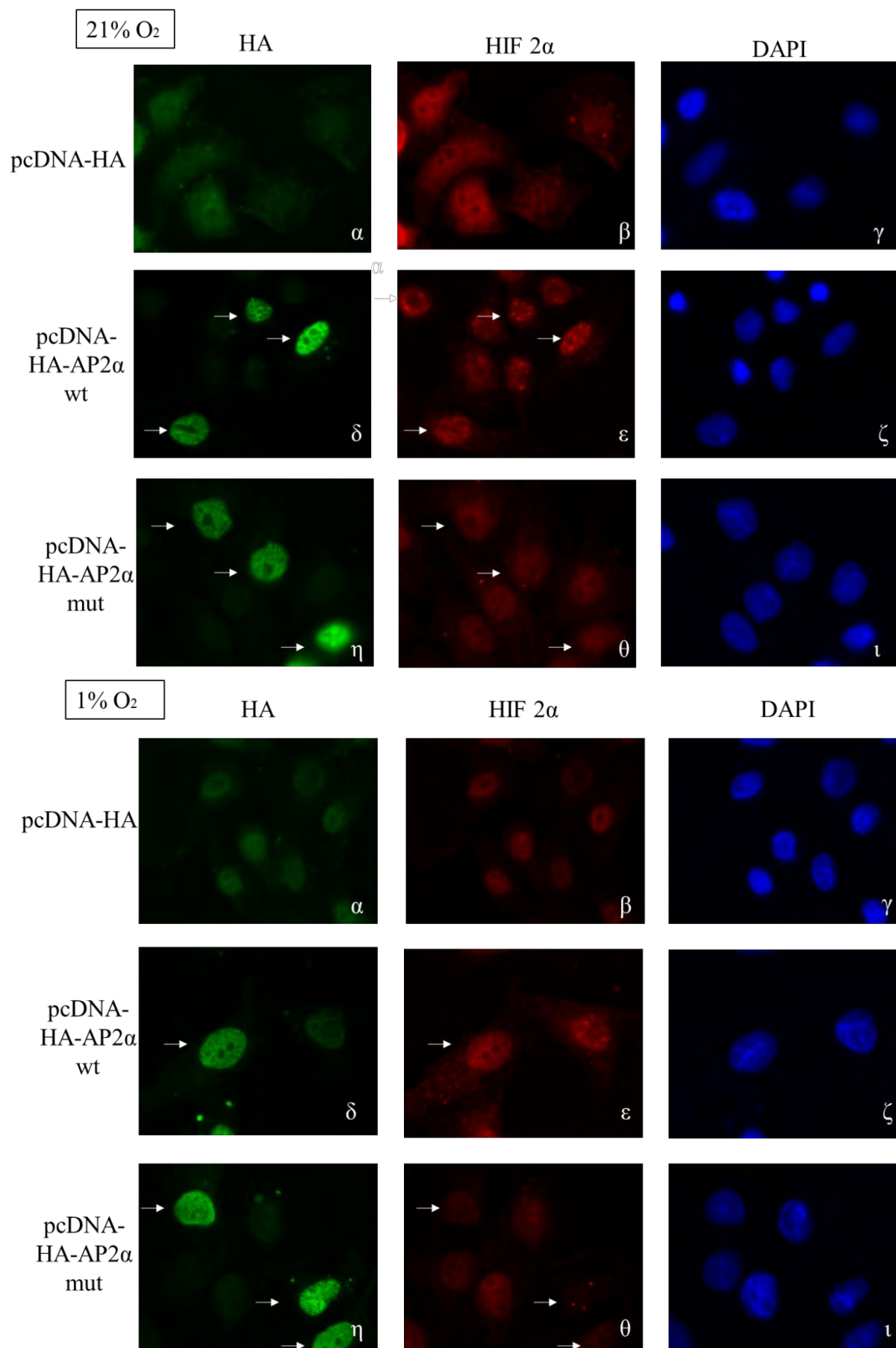


Εικόνα 20: Έλεγχος υπερέκφρασης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών HA-AP2α wt και HA-AP2α mut σε κύτταρα HeLa σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας. Τα κύτταρα HeLa διαμολύνθηκαν με: pcDNA-HA-AP2α wt (Διαδρομές 3, 4), pcDNA-HA-AP2α mut (Διαδρομές 5, 6) και με τον άδειο φορέα pcDNA-HA (Διαδρομές 1, 2). Τα κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση με χρήση αντισωμάτων έναντι, του HIF-2α, του HA και της β-ακτίνης.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα (*Εικόνα 20*), παρατηρούμε ότι οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες HA-AP2α wt (διαδρομές 3 και 4) και HA-AP2α mut (διαδρομές 5 και 6) εκφράζονται στο αναμενόμενο μέγεθος (κοντά στα 55kD), ενώ το ποσό της έκφρασης τους δεν φαίνεται να επηρεάζεται από την συγκέντρωση οξυγόνου (διαδρομή 3 έναντι διαδρομής 4 για το wt, και διαδρομή 5 έναντι διαδρομής 6 για τον mut αντίστοιχα) . Επίσης φαίνεται ότι η μορφή HA-AP2α mut παρουσιάζει έντονη πρωτεόλυση.

Ο εντοπισμός της θέσης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών μέσα στο κύτταρο γίνεται με έμμεσο ανοσοφθορισμό (*Μέθοδοι 4.18*). Για το σκοπό αυτό, αρχικά τα κύτταρα αναπτύχθηκαν πάνω σε καλυπτρίδες και έπειτα, διαμολύνθηκαν με πλασμιδιακό DNA: pcDNA3.1-HA-AP2α wt, pcDNA3.1-HA-AP2α mut, ως control χρησιμοποιήθηκε ο κενός φορέας pcDNA3.1-HA. Κατόπιν, έγινε επώαση για 24 ώρες σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας. Ακολούθησε ανοσοφθορισμός με αντίσωμα έναντι του επίτοπου HA, ενώ χρησιμοποιήθηκε και αντίσωμα έναντι του HIF2α ως δείκτης δράσης της υποξίας. Τα αποτελέσματα ανίχνευσης του υποκυτταρικού εντοπισμού των μορφών του HA-AP2α παρουσιάζονται στην *Εικόνα 21*.

Αρχικά παρατηρούμε ότι ο υπερεκφρασμένος HA-AP2α wt εντοπίζεται στον πυρήνα, όπως αναμενόταν (και από τα πειράματα 5.1.1, *Εικόνα 15*). Ο εντοπισμός αλλά και η ένταση του σήματος του HA-AP2α wt δεν φαίνεται να αλλάζει στην υποξία. Επίσης δεν παρατηρείται κάποια διαφορά τόσο στον εντοπισμό όσο και στην έκφραση μεταξύ του HA-AP2α wt (*Εικόνα 21δ*) και του HA-AP2α mut (*Εικόνα 21η*). Τα κύτταρα που έχουν διαμολυνθεί με τον κενό φορέα pcDNA-HA (α, β, γ) και χρησιμοποιούνται σαν control, τόσο στη νορμοξία όσο και στην υποξία δίνουν ένα διάχυτο σήμα το οποίο πιθανόν να οφείλεται στη χρώση που δίνει το HA πεπτίδιο, δεδομένου ότι διαχέεται ελεύθερα στο κύτταρο λόγω του μικρού μεγέθους του. Ο HIF2α που χρησιμοποιήθηκε σαν μάρτυρας δράσης της υποξίας δίνει μη αναμενόμενο έντονο διάχυτο σήμα στην νορμοξία. Αυτό πιθανά συνέβη γιατί το αντίσωμα έναντι του HIF2α (*Υλικά 3.8*) που χρησιμοποιήθηκε πιθανά αναγνωρίζει μη ειδικά άλλες πρωτεΐνες, επομένως κρίνεται ακατάλληλο για χρήση σε ανοσοφθορισμό.



Εικόνα 21: Έλεγχος υποκυτταρικού εντοπισμού των HA-AP2α wt και HA-AP2 mut σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας σε κύτταρα HeLa με έμμεσο ανοσοφθορισμό. Χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα έναντι του HA επίτοπου, ενώ χρησιμοποιήθηκε και αντίσωμα έναντι του HIF2α ως δείκτης δράσης της υποξίας. Τα κύτταρα διαμολύνθηκαν με τον άδειο φορέα pcDNA-HA (α, β, γ), με pcDNA-HA-AP2α wt (δ, ε, ζ) και με pcDNA-HA-AP2α mut (η, θ, ι). Με άσπρα βέλη σημειώνονται τα κύτταρα που έχουν προσλαβει εξωγενές DNA. Στις εικόνες γ,ζ,η φαίνονται οι πυρήνες των κυττάρων μετά απο χρώση με τη χρωστική DAPI.

5.4 Έλεγχος της σουμοϋλίωσης του HA-AP2α wt και HA-AP2α mut σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας.

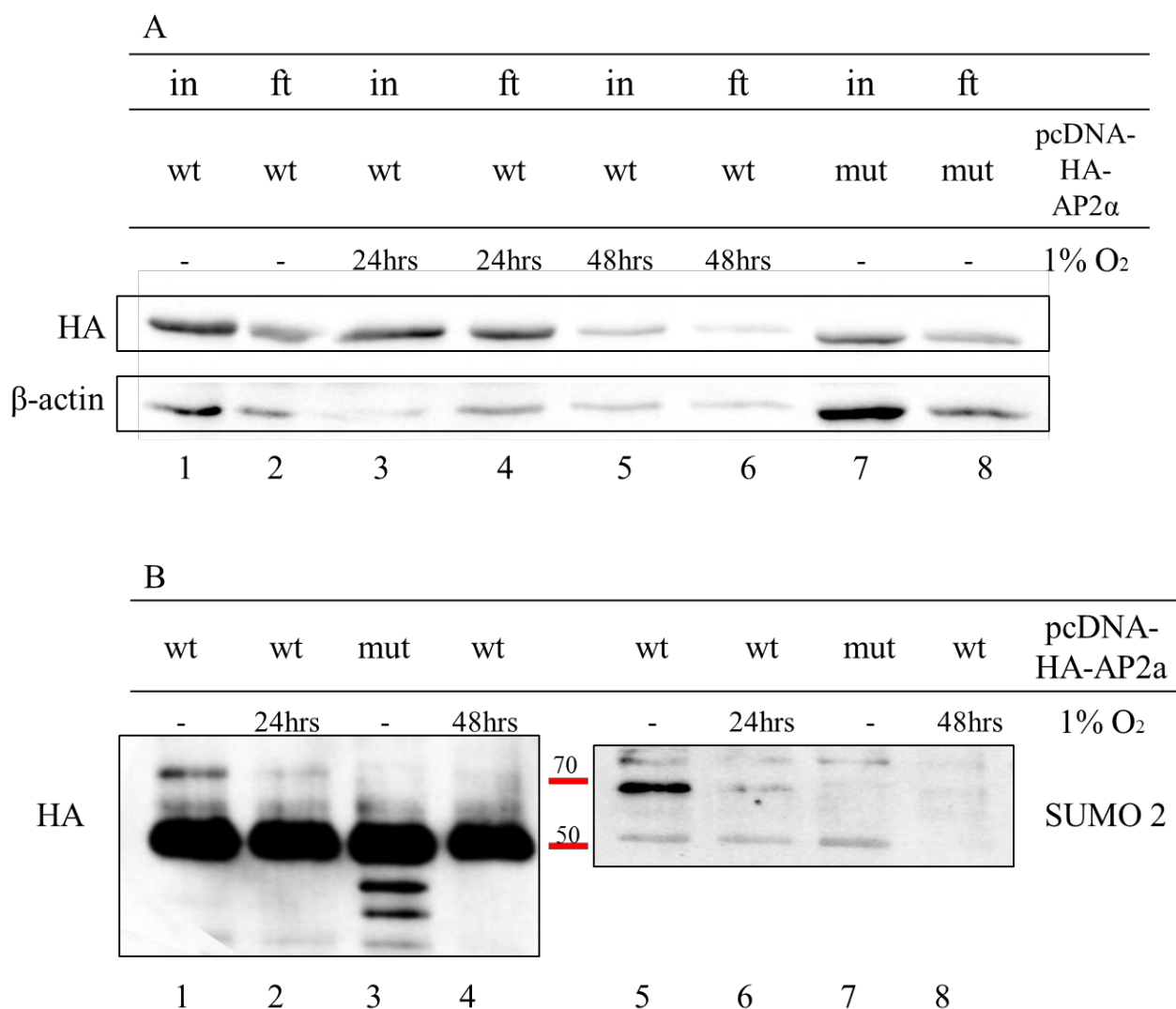
Έχοντας επιβεβαιώσει ότι οι κατασκευές pcDNA-HA-AP2α wt και pcDNA-HA-AP2α mut είναι σωστές, και οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούν εκφράζονται και συμπεριφέρονται με τον αναμενόμενο τρόπο προχωρήσαμε σε ανίχνευση της σουμοϋλίωσης των υπερεκφρασμένων AP-2α μορφών και μελέτη της μεταβολής της απο την υποξία. Όπως έχει ήδη αναφερθεί απο τα προκαταρκτικά πειράματα βρέθηκε ότι η σουμοϋλίωση του ενδογενούς AP2α με SUMO2 μειώνεται σε συνθήκες υποξίας, χωρίς όμως να μειώνονται τα επίπεδα έκφρασής του. Επίσης τα πειράματα μας (5.3) έδειξαν πως η υποξία δεν επηρεάζει τα επίπεδα της υπερεκφρασμένης HA-AP2α. Στόχος των παρακάτω πειραμάτων ήταν να ελεγχθεί εαν υφίσταται και κατα πόσο επηρεάζεται η σουμοϋλίωση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης HA-AP2α από την υποξία.

Για να επιβεβαιώσουμε τη σουμοϋλίωση του μεταγραφικού παράγοντα HA-AP2α καθώς και την έλλειψή της στο μετάλλαγμα, και το πως αυτή επηρεάζεται απο το υποξικό περιβάλλον, προχωρήσαμε σε πειράματα ανοσοκατακρήμνισης με σκοπό τον εμπλουτισμό της σουμοϋλιωμένης πρωτεΐνης, την απομόνωσή και την ταυτοποίηση της με ανοσοανίχνευση χρησιμοποιώντας αντίσωμα έναντι του HA.

5.4.1 Ανοσοκατακρήμνιση HA σημασμένων πρωτεϊνών από κύτταρα που έχουν διαμολυνθεί με τις πλασμιδιακές κατασκευές pcDNA 3.1-HA-AP2α wt και pcDNA 3.1-HA-AP2α mut.

Προκειμένου να προχωρήσουμε σε πειράματα ανοσοκατακρήμνισης (Μέθοδοι 4.17) έγινε διαμόλυνση με τις πλασμιδιακές κατασκευές pcDNA3.1-HA-AP2α wt και pcDNA3.1-HA-AP2α mut. Τα κύτταρα επώαστηκαν σε συνθήκες νορμοξίας, υποξίας για 24 ώρες, και υποξίας για 24 και 48 ώρες και στη συνέχεια έγινε δοκιμασία ανοσοκατακρήμνισης χρησιμοποιώντας σφαιρίδια συζευγμένα με HA αντίσωμα, τα οποία αναγνωρίζουν και καθηλώνουν πρωτεΐνες που περιέχουν τον επίτοπο HA. Συλλέχθηκε δείγμα απο το ολικό εκχύλισμα κυττάρων πριν απο την ανοσοκατακρήμνιση (input, in), απο το αδέσμευτο στη στήλη εκχύλισμα μετά την ανοσοκατακρήμνιση που περιέχει πρωτεΐνες που δεν έχουν δεσμευτεί στα HA-σφαιρίδια (flow-through, ft) και τέλος απο το έκλουσμα, που περιέχει τις πρωτεΐνες που δεσμεύτηκαν και

εκλούστηκαν από τα σφαιρίδια (eluate, el). Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου, υπο αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE), και στη συνέχεια έγινε ανοσοαποτύπωση κατά Western και ανοσοανίχνευση με αντισώματα έναντι του HA επίτοπου, της SUMO2 και της β-ακτίνης (έλεγχος ισοφορτώματος). Τα αποτελέσματα φαίνονται παρακάτω στην *Εικόνα 22*.



Εικόνα 22 Α) Έλεγχος της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης HA-AP2α wt και HA-AP2α mut σε συνθήκες νορμοξίας-υποξίας, στο ολικό κυτταρικό εκχύλισμα (input,in) και στο αδέσμευτο στη στήλη εκχύλισμα (flow-through, ft) μετά την ανοσοκατακρήμνιση με HA σφαιρίδια. Τα δείγματα αναλύθηκαν με SDS-PAGE και έγινε ανοσοανίχνευση με αντισώματα έναντι του HA και της β-ακτίνης.

Β) Έλεγχος της σουμοϋλίωσης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης HA-AP2α wt και HA-AP2α mut σε συνθήκες νορμοξίας-υποξίας σε εκλούσματα μετά την ανοσοκατακρήμνιση. Τα δείγματα αναλύθηκαν με SDS-PAGE και έγινε ανοσοανίχνευση με αντισώματα έναντι του HA και του SUMO2 πεπτιδίου.

Στην *Εικόνα 22Α*, φαίνεται η έκφραση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών HA-AP2α wt και HA-AP2α mut στο ολικό εκχύλισμα των κυττάρων που χρησιμοποιήθηκε για την κατακρήμνιση. Βλέπουμε ότι η έκφραση των υπερεκφρασμένων πρωτεϊνών τόσο wt όσο και mut δεν αλλάζει σε υποξία (διαδρομές 1 και 3), ωστόσο η έκφραση φαίνεται να πέφτει στις 48 ώρες (διαδρομή 5). Πιθανόν αυτό να συμβαίνει γιατί η ποσότητα πρωτεΐνης που αναλύθηκε για τις 48 ώρες ήταν λιγότερη από αυτή στις 24 όπως δείχνει και η ποσότητα β-ακτίνης. Επίσης πιθανά τα επίπεδα της υπερεκφρασμένης πρωτεΐνης μειώνονται μετά από 48 ώρες μετά τη διαμόλυνση, γεγονός που συχνά παρατηρείται σε διαμολυσμένα συστήματα κυττάρων. Όσον αφορά στην ανάλυση του αδέσμευτου στα σφαιρίδια κλάσματος στις περισσότερες περιπτώσεις φαίνεται να μειώνεται η ποσότητα της HA-ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης σε σχέση με το εκχύλισμα (διαδρομές 2, 6 και 8) που σημαίνει πως σημαντικό ποσό HA-πρωτεΐνης δεσμεύτηκε με επιτυχία στα σφαιρίδια.

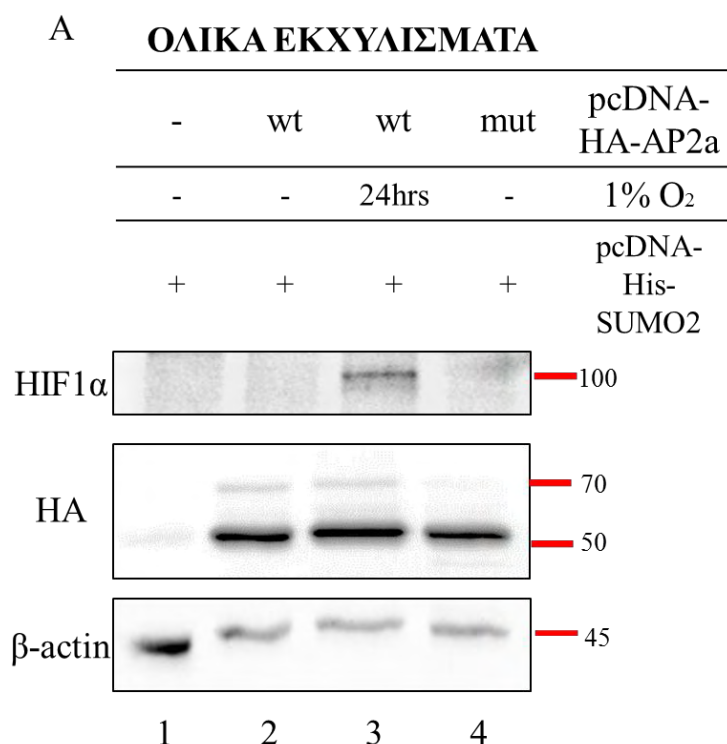
Στην *Εικόνα 22Β*, βλέπουμε τις πρωτεΐνες που συνδέθηκαν και εκλούστηκαν από τα HA σφαιρίδια. Ανιχνεύθηκε σημαντική ποσότητα HA-πρωτεΐνης στα εκλούσματα σε όλες τις συνθήκες, γεγονός που επιβεβαιώνει την επιτυχία του πειράματος. Οι διαδρομές 1-4 αντιστοιχούν σε ανοσοανίχνευση με το HA αντίσωμα. Οι έντονες ζώνες στα 55 kD αντιστοιχούν στον ανοσοκατακρημνισμένο HA-AP2α. Παρατηρούμε ότι στη διαδρομή 1 κατακρημνίζεται και μια δεύτερη πρωτεΐνη πάνω από τα 70 kD που πιθανά αντιστοιχεί στη σουμοϋλιωμένη μορφή ενώ η ίδια μορφή δεν κατακρημνίζεται στη διαδρομή 3 που αντιστοιχεί στο μέταλλαγμα που έχει χάσει την ικανότητα σουμοϋλίωσης. Επομένως, συμπεραίνουμε ότι η Lys στη θέση 10 αποτελεί οντως θέση σουμοϋλίωσης (επιβεβαιώνοντας προηγούμενη μελέτη) αλλά φαίνεται να είναι και η μοναδική ή η κυριότερη θέση σουμοϋλίωσης του AP-2α. Όσον αφορά την επίδραση της υποξίας στην σουμοϋλίωση του HA-AP2α, παρατηρούμε ότι η σουμοϋλιωμένη ζώνη φαίνεται να μειώνεται στις 24 ώρες (διαδρομή 2), και σχεδόν εξαφανίζεται στις 48 ώρες (διαδρομή 4), γεγονός που επιβεβαιώνει την αρχική μας υπόθεση.

Στα εκλούσματα έγινε ανοσοανίχνευση και με αντίσωμα έναντι της SUMO2 πρωτεΐνης (διαδρομές 5-8). για να επιβεβαιωθεί πως η ζώνη των 70 kDa είναι οντως η σουμοϋλιωμένη μορφή της AP2α. Χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα έναντι του SUMO-2 διότι από τα προκαταρκτικά πειράματα SILAC (*Εισαγωγή 1.2.7*) ο AP-2α εντοπίστηκε στην ανοσοκατακρήμνιση των SUMO2 σουμοϋλιωμένων πρωτεϊνών γεγονός που δείχνει πως η πρωτεΐνη τροποποιείται από τη SUMO2. Και πάλι επιβεβαιώνεται ότι η ζώνη αντιστοιχεί στην σουμοϋλιωμένη μορφή αφού αντιδρά με το SUMO2 αντίσωμα. Και εδώ η υποξία μειώνει την σουμοϋλίωση του HA-AP2α, στις 24 ώρες υποξίας (διαδρομή 6), ενώ χάνεται τελείως στις 48 ώρες (διαδρομή 8).

5.4.2 Ανοσοκατακρήμνιση HA σημασμένων πρωτεϊνών από κύτταρα που έχουν συνδιαμολυνθεί με τις πλασμιδιακές κατασκευές pcDNA 3.1-HA-AP2α wt, pcDNA 3.1-HA-AP2α mut και pcDNA3.1-His-SUMO2.

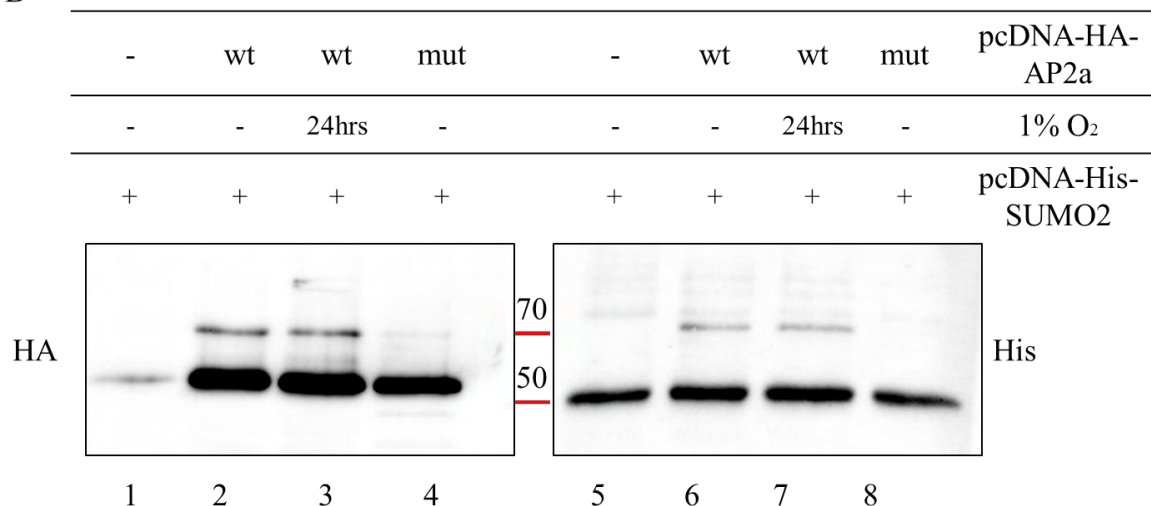
Παράλληλα με τα παραπάνω αποτελέσματα προχωρήσαμε σε ένα δεύτερο πείραμα ανοσοκατακρήμνισης, όπου αυτή τη φορά τα κύτταρα συνδιαμολύνθηκαν με pcDNA3.1-HA-AP2α wt, pcDNA3.1-HA-AP2α mut και pcDNA3.1-His-SUMO2. Αποφασίσαμε να υπερεκφράσουμε την SUMO2 πρωτεΐνη γιατί η διαθεσιμότητα της SUMO πρωτεΐνης είναι συχνά ο περιοριστικός παράγοντας για την σουμοϋλίωση πρωτεϊνών, ενώ επιτρέπεται ευκολότερα η ταυτοποίηση της σουμοϋλίωσης με εξωγενή SUMO2 πρωτεΐνη, με αντίσωμα έναντι του His.

Κύτταρα HeLa διαμολύνθηκαν με: pcDNA-HA & pcDNA-His-SUMO2 (control), pcDNA-HA-AP2α wt & pcDNA-His-SUMO2, pcDNA-HA-AP2α & pcDNA-His-SUMO2 και τα κύτταρα επώασθηκαν σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας για 24 ώρες. Συλλέχθηκε δείγμα από το ολικό εκχύλισμα κυττάρων πριν από την ανοσοκατακρήμνιση, από το αδέσμευτο στη στήλη εκχύλισμα μετά την ανοσοκατακρήμνιση και από το έκλουσμα. Τα δείγματα αναλύθηκαν με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση, και στη συνέχεια έγινε ανοσοανίχνευση με αντισώματα έναντι: του HA επίτοπου, του His επίτοπου, του HIF1α (έλεγχος δράσης υποξίας) και της β-ακτίνης (έλεγχος ισοφορτώματος). Τα αποτελέσματα φαίνονται παρακάτω (Εικόνα 23).



B

ΕΚΛΟΥΣΜΑΤΑ



Εικόνα 23 Α) Έλεγχος της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης HA-AP2a wt και HA-AP2a mut σε συνθήκες νορμοξίας-υποξίας, στο ολικό κυτταρικό εκχύλισμα. Τα δείγματα αναλύθηκαν με SDS-PAGE και έγινε ανοσοανίχνευση με αντισώματα έναντι του HA επίτοπου, του HIF1a (δείκτης δράσης υποξίας) και της β-ακτίνης (δείκτης ισοφορτώματος).

Β) Έλεγχος της σουμοϋλίωσης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης HA-AP2a wt και HA-AP2a mut σε συνθήκες νορμοξίας-υποξίας που εκλούστηκε από τα σφαιρίδια μετά την ανοσοκατακρήμνιση. Τα δείγματα αναλύθηκαν με SDS-PAGE και έγινε ανοσοανίχνευση με αντισώματα έναντι του HA και του His επίτοπου..

Στην Εικόνα 23Α αναλύθηκε το ολικό κυτταρικό εκχύλισμα, όπου φαίνεται η έκφραση των HA-AP2a wt και HA-AP2a mut. Επιβεβαιώνεται και πάλι ότι η έκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης δεν μεταβάλλεται στην υποξία (η επαγωγή του HIF1a στη διαδρομή 3 μαρτυρά την ύπαρξη υποξίας στα κύτταρα). Παρατηρούμε από τα ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα, οι (διαδρομές 2 και 3) που αντιστοιχούν στον HA-AP2a wt πως ήδη εμφανίζεται και μια δεύτερη ζώνη στα 75 kD που πιθανά αντιστοιχεί στην σουμοϋλιωμένη μορφή που παρατηρήθηκε στο προηγούμενο πείραμα (5.4.1). Παρατηρούμε ότι αυτή η ζώνη χάνεται τελείως στη διαδρομή 4 που αντιστοιχεί στον HA-AP2a mut όπως θα αναμέναμε.

Στην Εικόνα 23Β αναλύθηκαν τα εκλούσματα της ανοσοκατακρήμνισης. Οι διαδρομές 1-4 αντιστοιχούν σε πρωτεΐνες που εκλούστηκαν από τα σφαιρίδια και επώαστηκαν με αντίσωμα έναντι του HA. Κατ'αντιστοιχία με τα προηγούμενα αποτελέσματα βλέπουμε μια μορφή του HA-AP2a wt να εμφανίζεται στα 75kD (διαδρομές 2 και 3) ενώ δεν εμφανίζεται στη διαδρομή 4 που αντιστοιχεί στον HA-AP2a mut. Η μορφή αυτή αντιδρά με το His αντίσωμα (διαδρομές 6 και 7) που σημαίνει ότι είναι τροποποιημένη με την εξωγενή His-SUMO2 πρωτεΐνη. Άρα έχουμε ακόμα

μια επιβεβαίωση στο ότι η θέση σουμυλίωσης στη Lys10 είναι και η μοναδική θέση σουμυλίωσης.

Οι διαδρομές 6 και 7 που αντιστοιχούν στον HA-AP2α wt δίνουν ζώνη ίσης έντασης στα 75kD που αντιστοιχεί στην σουμυλίωση με His-SUMO2. Η έντονη ζώνη που εμφανίζεται στα 55kD σε όλες τις διαδρομές (και στο control) είναι πιθανόν κάποια μη ειδική ζώνη. Σε αντίθεση με το προηγούμενο πείραμα ανοσοκατακρήμνισης (5.4.1), εδώ δεν παρατηρούμε κάποια διαφορά στη σουμυλίωση του HA-AP2α μεταξύ νορμοξίας και υποξίας (διαδρομή 6 σε σύγκριση με τη διαδρομή 7). Μια εξήγηση μπορεί να είναι, το γεγονός ότι εδώ έχουμε ένα τεχνητό, υπερεκφρασμένο σύστημα όπου η SUMO2 πρωτεΐνη είναι σε περίσσεια, και πιθανώς δεν υπόκειται πλέον στην εξειδικευμένη ρύθμιση από την χαμηλή συγκέντρωση οξυγόνου.

6 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η κατάσταση χαμηλής συγκέντρωσης οξυγόνου (1% O₂) που ορίζεται ως υποξία, αποτελεί ένα ερέθισμα που μπορεί να συμβεί τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές συνθήκες στον ανθρώπινο οργανισμό. Έχοντας ως στόχο την διατήρηση της ομοιοστασίας οξυγόνου, και την ισορροπία των οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων, η ανταπόκριση του οργανισμού σε καταστάσεις υποξίας περιλαμβάνει την επαγωγή του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1 και την ενεργοποίηση γονιδίων που βρίσκονται υπό τον έλεγχο του (καθυστερημένη/αργή απόκριση - late response) (1). Σε μια πιο γρήγορη απόκριση (early response), παρατηρούνται άμεσες τροποποιήσεις τόσο του HIF-1 όσο και άλλων πρωτεϊνών κυρίως μέσω μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων (14). Μία τέτοιου είδους τροποποίηση είναι και η σουμοϋλίωση, η οποία περιλαμβάνει την ομοιοπολική σύνδεση πρωτεϊνών με τη SUMO πρωτεΐνη. Η σουμοϋλίωση μπορεί να τροποποιεί και να ρυθμίζει μια πρωτεΐνη με πολλαπλούς τρόπους (ρύθμιση κυτταρικού εντοπισμού, απόκρυψη ή δημιουργία νέων περιοχών αλληλεπίδρασης, δομικές αλλαγές κ.α.) (15)

Η μετα-μεταφραστική τροποποίηση με προσθήκη της SUMO πρωτεΐνης παίζει σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο στη λειτουργία των πρωτεϊνών. Πολλές πρωτεΐνες που εμπλέκονται σε διαδικασίες όπως η μεταγραφή, η αναδιάρθρωση χρωματίνης, η επιδιόρθωση του DNA κ.α. αποτελούν υπόστρωμα για σουμοϋλίωση, ενώ ο αντιστρεπτός χαρακτήρας αυτής της τροποποίησης είναι επίσης πολύ σημαντικός. Παρόλο που μερικοί στόχοι βρίσκονται συνεχώς σουμοϋλιωμένοι στο κύτταρο οι περισσότερες πρωτεΐνες σουμοϋλιώνονται παροδικά η κατόπιν ρύθμισης. Αλλαγές του γενικού προτύπου σουμοϋλίωσης έχουν παρατηρηθεί κάτω από διάφορες καταστάσεις στρες όπου φαίνεται να προκαλούνται μαζικές αλλαγές στη σουμοϋλίωση των πρωτεϊνών. Τέτοια παράδειγματα αποτελούν το θερμικό σοκ στα θηλαστικά, και η ισχαιμία σε ποντικούς που οδηγούν σε σημαντική αύξηση των συνδεδεμένων με τη SUMO πρωτεϊνών, ενώ αντίθετα οι ιϊκές μολύνσεις και το οξειδωτικό στρες οδηγούν σε γενικότερη ελάττωση των σουμοϋλιωμένων μορφών των πρωτεϊνών (56). Η υποξία αποτελεί επίσης ένα στρεσογόνο ερέθισμα για το κύτταρο, όπου ο ρόλος των σουμοϋλιωμένων πρωτεϊνών και πως αυτές τροποποιούνται στην υποξία δεν έχει αποσαφηνιστεί ακόμα. Είναι γνωστό πάντως πως πολλοί παράγοντες του μονοπατιού της υποξίας σουμοϋλιώνονται όπως οι HIF-1α, HIF-2α, ARNT, vHL, και CBP/p300 (26).

Προκειμένου να ανιχνευθούν ποιές πρωτεΐνες αλλάζουν το πρότυπο σουμοϋλίωσης τους μετά την κυτταρική έκθεση σε υποξία έγινε ποσοτική πρωτεομική ανάλυση των ενδογενών σουμοϋλιωμένων πρωτεϊνών σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας (αδημοσίευτα αποτελέσματα Χαχάμη Γεωργία, *Εισαγωγή 1.2.7*). Από την ανάλυση αποδείχθηκε πως πολλές πρωτεΐνες αλλάζουν (αυξάνουν είτε μειώνουν) την σουμοϋλίωση τους σε υποξία, χωρίς όμως να μεταβάλλουν τα επίπεδα έκφρασής τους. Ανάμεσα σε αυτές τις πρωτεΐνες είναι και ο μεταγραφικός παράγοντας TFAP2α (AP2α), του οποίου η σουμοϋλίωση μειώνεται κατά 1.5 φορές στην υποξία σε σχέση με

την νορμοξία. Ο AP2α είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που εμπλέκεται σε διαδικασίες ανάπτυξης, πολλαπλασιασμού, διαφοροποίησης, επιβίωσης και απόπτωσης των κυττάρων (57). Επιπλέον, ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός πως ο AP2α φαίνεται να αλληλεπιδρά και με παράγοντες που εμπλέκονται στο μονοπάτι της υποξίας (43, 52) όπως ο CITED2, ο συνενεργοποιητής CBP/P300, αλλά ακόμα και με τους HIF1α και HIF2α (53, 54). Εξαιτίας λοιπόν της αλληλεπίδρασης που μπορεί να έχει ο AP2α με παράγοντες της υποξίας και του γεγονότος ότι εμπλέκεται σε διαδικασίες καρκινογένεσης μας οδήγησε στην περαιτέρω μελέτη της σουμοϋλίωσης του AP2α και της ρύθμισης της από το υποξικό στρες.

Η παρούσα εργασία είναι μέρος της γενικότερης μελέτης της ρύθμισης της σουμοϋλίωσης του AP2α από την υποξία, αλλά και του γενικότερου ρόλου της σουμοϋλίωσης στην κυτταρική απόκριση στο υποξικό ερέθισμα. Στόχος της παρούσας διπλωματικής ήταν αφενός να δημιουργηθούν εργαλεία που επιτρέπουν την υπερέκφραση του ανασυνδυασμένου HA-AP2α, τα οποία θα βοηθήσουν μελλοντικά στην έρευνα αυτού του μεταγραφικού παράγοντα και αφετέρου να μελετηθεί η υπερέκφραση και το πρότυπο σουμοϋλίωσης του υπερεκφρασμένου HA-AP2α σε καταστάσεις νορμοξίας και υποξίας.

Για τον λόγο αυτό κατασκευάστηκαν με κλωνοποίηση πλασμιδιακές κατασκευές που οδηγούν στην υπερέκφραση του ανθρώπινου AP2α σε σύντηξη με το πεπτίδιο HA. Η κλωνοποίηση έγινε με επιτυχία και οι νέες πλασμιδιακές κατασκευές ελέγχθηκαν αφ' ενός με πύλη από περιοριστικά ένζυμα (*Αποτελέσματα, Εικόνα 19*) και αφ' ετέρου με αλληλούχιση, προκειμένου να βρεθούν τυχόν σημειακές μεταλλάξεις. Οι δυο αυτές πλασμιδιακές κατασκευές αποτέλεσαν το βασικό εργαλείο για τα μετέπειτα πειράματα. Ο επίτοπος HA δίνει την δυνατότητα να διακρίνουμε τον ενδογενή από τον υπερεκφρασμένο AP2α. Επιτρέπει επίσης την εκλεκτική ανοσοκατακρήμνιση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης χρησιμοποιώντας αντίσωμα έναντι του HA.

Μελετώντας αρχικά την έκφραση και τον υποκυττάριο εντοπισμό των δυο μορφών του HA-AP2α παρατηρήθηκε πως ο εξωγενής HA-AP2α, τόσο ο αγρίου τύπου όσο και ο μεταλλαγμένος, εντοπίστηκε στον πυρήνα (*Αποτελέσματα, Εικόνα 21*), και εκφράστηκε σε σημαντικές ποσότητες περίπου στα 55kD (*Αποτελέσματα, Εικόνα 20*) δηλαδή στο αναμενόμενο μέγεθος. Συνεπώς οι πλασμιδιακές κατασκευές είναι σωστές και εκφράζουν τη σωστή και πιθανά λειτουργική πρωτεΐνη. Τα αποτελέσματα του ανοσοφθορισμού έδειξαν ότι η συμπεριφορά των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών ακολουθούν το πρότυπο του ενδογενούς (*Αποτελέσματα, Εικόνα 15*), γεγονός που δίνει την πληροφορία ότι ο επίτοπος HA δεν προκαλεί κάποια αλλαγή στη λειτουργικότητά τους ή στην υποκυττάρια χωροθέτησή τους και άρα μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε περαιτέρω πειράματα υπερέκφρασης. Αξίζει να σημειωθεί πως κατά τον έλεγχο των μη-σημασμένων πρωτεϊνών δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στην έκφραση και στον εντοπισμό μεταξύ του AP2α wt και του AP2α mut που έχει χάσει την ικανότητα σουμοϋλίωσης (*Αποτελέσματα, Εικόνα 15(δ,η)*).

Ένας απο τους πολλούς ρόλους της σουμοϋλίωσης στο κύτταρο είναι και η ρύθμιση του υποκυττάρου εντοπισμού των πρωτεϊνών. Κρίνοντας απο τα αποτελέσματα, η σουμοϋλίωση του AP2α δεν παίζει ρόλο στον εντοπισμό του μεταγραφικού παράγοντα, αλλά πιθανά εξυπηρετεί κάποια άλλη λειτουργία, που μένει να διαλευκανθεί. Κατά τη σύγκριση της έκφρασης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών HA-AP2α wt και HA-AP2α mut σε συνθήκες νορμοξίας και υποξίας παρατηρήθηκε πως η υποξία δεν προκαλεί κάποια επίδραση στα επίπεδα έκφρασης (*Αποτελέσματα, Εικόνα 20*) ή στον υποκυττάριο εντοπισμό (*Αποτελέσματα, Εικόνα 21*) τόσο του HA-AP2α αγρίου τύπου όσο και της μεταλλαγμένης μορφής, γεγονός που συμφωνεί με προηγούμενες αδημοσίευτες παρατηρήσεις του εργαστηρίου πάνω στην έκφραση του ενδογενή TFAP2α στην υποξία.

Προκειμένου να ελεγχθεί η σουμοϋλίωση του HA-AP2α και πως αυτή μεταβάλλεται σε συνθήκες υποξίας, έγιναν πειράματα ανοσοκατακρήμνισης σε κύτταρα που διαμολύνθηκαν με τις πλασμιδιακές κατασκευές και χρησιμοποιήθηκαν σφαιρίδια συζευγμένα με HA αντίσωμα. Απο την ύπαρξη μιας μορφής του HA-AP2α με μικρότερη κινητικότητα απο την κύρια μορφή (20kDa διαφορά) η οποία αντιδρά με αντίσωμα έναντι της SUMO2, και εξαφανίζεται στην περίπτωση του HA-AP2α mut (*Αποτελέσματα, Εικόνα 22B*) επιβεβαιώθηκαν προηγούμενες προβλέψεις και δημοσιευμένα αποτελέσματα (51) ότι η μοναδική θέση σουμοϋλίωσης του HA-AP2α είναι στη Lys10. Επιπλέον, βρέθηκε ότι ο HA-AP2α σουμοϋλιώνεται απο την SUMO2 πρωτεΐνη, γεγονός που συμφωνεί με το προκαταρκτικό πείραμα της Χαχάμη Γεωργίας όπου ο ενδογενής AP2α βρέθηκε μετά απο ανοσοκατακρήμνιση με το SUMO2/3 αντίσωμα και όχι με το SUMO1.

Πρωταρχικός στόχος της μελέτης ήταν η επίδραση της υποξίας στη σουμοϋλίωση του ανασυνδυασμένου HA-AP2α. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως τα επίπεδα του σουμοϋλιωμένου HA-AP2α φαίνεται να μειώνονται στην υποξία ήδη απο τις 24 ωρες έκθεσης, ενώ φαίνεται να εξαφανίζονται τελείως στις 48 ωρες έκθεσης των κυττάρων σε υποξία (*Αποτελέσματα, Εικόνα 22B*). Έτσι έχουμε μια ισχυρή επιβεβαίωση των προκαταρκτικών ευρημάτων της κας Χαχάμη όπου η σουμοϋλίωση του ενδογενή AP2α φαίνεται να μειώνεται μετά απο 48 ωρες έκθεσης σε υποξία. Εδώ πρέπει να σημειωθεί ότι στον έλεγχο μας οι 48 ωρες έκθεσης σε υποξία δεν ήταν οι βέλτιστες για το πείραμα διότι η υπερέκφραση του HA-AP2α είναι γενικά μειωμένη στις 48 ωρες στο ολικό κυτταρικό εκχύλισμα (*Αποτελέσματα, Εικόνα 22A*). Αυτό πιθανόν να συνέβη γιατί μετά απο 48ώρες μειώνεται η ικανότητα των κυττάρων να εκφράσουν τον εξωγενή HA-AP2α στο σύστημα παροδικής διαμόλυνσης που χρησιμοποιήθηκε και άρα πρέπει να ληφθεί υπόψη στα μελλοντικά πειράματα.

Πολλές φορές τα επίπεδα της SUMO1 ή της SUMO2 στο κύτταρο μπορεί να αποτελέσουν τον περιοριστικό παράγοντα για την σουμοϋλίωση των πρωτεϊνών (15). Για να αποφύγουμε αυτόν τον περιορισμό έγινε δεύτερο πείραμα ανοσοκατακρήμνισης όπου αυτή τη φορά τα κύτταρα συνδιαμολύνθηκαν και με το πλασμίδιο που κωδικοποιεί την ανασυνδυασμένη His-SUMO2

πρωτεΐνη. Τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν τα προηγούμενα πειράματα ότι η θέση σουμοϋλίωσης στη Lys10 είναι η μοναδική και ότι σουμοϋλιώνεται από τη SUMO2 (ο HA-AP2α σουμοϋλιώνεται από την εξωγενή His-SUMO2 (*Αποτελέσματα, Εικόνα 23B*)). Ωστόσο, στην περίπτωση αυτή δεν παρατηρήθηκε μείωση του σουμοϋλιωμένου HA-AP2α στις συνθήκες υποξίας για 24 ώρες (*Αποτελέσματα, Εικόνα 23B*). Αυτή η διαφοροποίηση από το πρώτο μας πείραμα μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι η υπερέκφραση μεγάλων ποσοτήτων της His-SUMO2 άλλαξε τις ισορροπίες μεταξύ αντιδρώντων πρωτεϊνών και ενζύμων σουμοϋλίωσης μέσα στο κύτταρο, με αποτέλεσμα πιθανά να μην μπορεί να ρυθμιστεί εκλεκτικά η σουμοϋλίωση ή η αποσουμοϋλίωση από την υποξία.

Συνοψίζοντας όλα τα παραπάνω, επιτεύχθηκε η κλωνοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα AP2α wt και AP2α mut σε πλασμιδιακό φορέα με επίτοπο HA. Ο έλεγχος έδειξε ότι οι πλασμιδιακές κατασκευές είναι σωστές και εκφράζουν τις σωστές πρωτεΐνες HA-AP2α wt και HA-AP2α mut, (έχει χάσει την ικανότητα σουμοϋλίωσης). Οι παραπάνω πλασμιδιακές κατασκευές αποτελούν σημαντικό εργαλείο και θα μπορέσουν να χρησιμοποιηθούν σε μελλοντικά πειράματα διαμόλυνσης και υπερέκφρασης. Όσον αφορά το άλλο σκέλος της εργασίας δηλαδή τη μελέτη της σουμοϋλίωσης του AP2α και πως αυτή μεταβάλλεται στην υποξία, αποδείχτηκε ότι ο HA-AP2α σουμοϋλιώνεται στη Lys10 από την SUMO2 και ότι η σουμοϋλιωμένη μορφή του HA-AP2α μειώνεται σε υποξία 24 ωρών γεγονός που αποδεικνύει τα εύρηματα του προκαταρκτικού ελέγχου που αφορούσαν τον ενδογενή AP2α.

Ως μελλοντικοί στόχοι μπορούν να αποτελέσουν περαιτέρω πειράματα που θα αποσαφηνίσουν από τη μια το ρόλο της σουμοϋλίωσης του AP2α κατά την υποξία, και από την άλλη το ρόλο της υποξίας στη μείωση της παρατηρούμενης σουμοϋλίωσης. Η υποξία αποτελεί μια κατάσταση στρες για το κύτταρο, και είναι γνωστό ότι σε καταστάσεις στρες αλλάζει το γενικό πρότυπο σουμοϋλίωσης στο κύτταρο. Προκειμένου να ανταπεξέλθει στις νέες συνθήκες το κύτταρο μπορεί να μεταβάλλει τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών και των ενζύμων που παίρνουν μέρος στο μηχανισμό σουμοϋλίωσης. Έχει προταθεί στη βιβλιογραφία ότι γενικά στην υποξία πιθανόν να υπάρχει αύξηση της σουμοϋλίωσης από τη SUMO1 (34), ενώ *in vivo* μελέτες ισχαιμικών μοντέλων που μοιάζουν με τα μοντέλα υποξίας έχουν δείξει αυξημένα επίπεδα της έκφρασης της SUMO1 αλλά και της σουμοϋλίωσης πολλών πρωτεϊνών (26). Στη δικιά μας μελέτη, δείξαμε ότι η υποξία μειώνει τη σουμοϋλίωση (από τη SUMO2 πρωτεΐνη) του μεταγραφικού παράγοντα AP2α. Είναι πιθανό η έλλειψη οξυγόνου να πυροδοτεί μεταβολές στα ένζυμα και τις πρωτεΐνες που παίρνουν μέρος στην σουμοϋλίωση του AP2α, όπως μείωση έκφρασης των συζευκτικών ενζύμων (E1, E2, E3) είτε ενεργοποίηση ή επαγωγή κάποιων αποσυζευκτικών ενζύμων (SENP), είτε τέλος μείωση στην έκφραση της ίδιας της διαθέσιμης SUMO2 πρωτεΐνης. Μελλοντικά πειράματα λοιπόν θα ήταν

η διαλεύκανση των ενζύμων που παίρνουν μέρος στη σουμοϋλίωση του AP2α και η μελέτη της έκφρασης τους (όπως SUMO E3 λιγάσες, SUMO ισοπεπτιδάσες κλπ) κάτω από υποξία.

Προκειμένου να διαλευκανθεί ο λειτουργικός ρόλος της σουμοϋλίωσης του AP2α στο μηχανισμό απόκρισης στην υποξία ένα ενδιαφέρον μελλοντικό πείραμα θα ήταν η μέτρηση της μεταγραφικής ενεργότητας των δυο μορφών του HA-AP2α τόσο σε συνθήκες νορμοξίας όσο και υποξίας (χρησιμοποιώντας τις HA πλασμιδιακές κατασκευές που κατασκευάσαμε). Από προηγούμενες μελέτες έχει βρεθεί ότι ο AP2α μπορεί να αλληλεπιδράσει με τον HIF2α σε κύτταρα μελανώματος (53), και με τον HIF1α σε κύτταρα ρινοφαρυγγικού καρκινώματος (54). Θα ήταν πολύ ενδιαφέρον να δούμε αν κάτι τέτοιο συμβαίνει σε καρκινικά κύτταρα επιθηλίου μήτρας που χρησιμοποιήθηκαν για τη παρούσα μελέτη, και εάν αυτή η αλληλεπίδραση επηρεάζεται ή όχι από την σουμοϋλίωση.

Συνοψίζοντας, πιστεύουμε πως λόγω του ότι ο ίδιος ο AP2α αλλά και η σουμοϋλίωση του φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο για την εξέλιξη της πορείας τύπων καρκίνου (55), αλλά και επειδή η υποξία είναι και αυτή ένα κύριο χαρακτηριστικό των περισσότερων όγκων (58), η διαλεύκανση των κυτταρικών μηχανισμών που ελέγχουν την αλληλεπίδραση των δυο μονοπατιών πιθανά να δώσει σημαντικές πληροφορίες και να βοηθήσει μελλοντικά στην κατανόηση της βιολογίας συγκεκριμένων τύπων όγκων.

7 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Semenza GL. Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Physiology* (Bethesda). 2009 Apr;24:97-106. PubMed PMID: 19364912.
2. Sonia M. Grow2: The HIF system, energy homeostasis and the cell cycle. *Histology and Histopathology*. 2014;29:589-600.
3. Zimna A, Kurpisz M. Hypoxia-Inducible Factor-1 in Physiological and Pathophysiological Angiogenesis: Applications and Therapies. *BioMed research international*. 2015;2015:549412. PubMed PMID: 26146622. Pubmed Central PMCID: 4471260.
4. Zhao J, Du F, Shen G, Zheng F, Xu B. The role of hypoxia-inducible factor-2 in digestive system cancers. *Cell death & disease*. 2015;6:e1600. PubMed PMID: 25590810.
5. Semenza GL. Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy. *Trends in pharmacological sciences*. 2012 Apr;33(4):207-14. PubMed PMID: 22398146. Pubmed Central PMCID: 3437546.
6. Keith B, Johnson RS, Simon MC. HIF1alpha and HIF2alpha: sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. *Nat Rev Cancer*. 2012 Jan;12(1):9-22. PubMed PMID: 22169972. Pubmed Central PMCID: 3401912.
7. Kim SH, Hwang D, Park H, Yang EG, Chung HS, Kim SY. The action of HIF-3α variants on HIF-2α–HIF-1β heterodimer formation is directly probed in live cells. *Experimental Cell Research*. 2015 8/15;336(2):329-37.
8. Rocha S. Gene regulation under low oxygen: holding your breath for transcription. *Trends in Biochemical Sciences*. 2007 8//;32(8):389-97.
9. Lisy K, Peet DJ. Turn me on: regulating HIF transcriptional activity. *Cell death and differentiation*. 2008 Apr;15(4):642-9. PubMed PMID: 18202699.
10. Martin SK, Diamond P, Gronthos S, Peet DJ, Zannettino ACW. The emerging role of hypoxia, HIF-1 and HIF-2 in multiple myeloma. *Leukemia*. 2011 10//print;25(10):1533-42.
11. Richard DE, Berra E, Gothié E, Roux D, Pouyssegur J. p42/p44 Mitogen-activated Protein Kinases Phosphorylate Hypoxia-inducible Factor 1α (HIF-1α) and Enhance the Transcriptional Activity of HIF-1. *Journal of Biological Chemistry*. 1999 November 12, 1999;274(46):32631-7.
12. Mylonis I, Chachami G, Samiotaki M, Panayotou G, Paraskeva E, Kalousi A, et al. Identification of MAPK Phosphorylation Sites and Their Role in the Localization and Activity of Hypoxia-inducible Factor-1α. *Journal of Biological Chemistry*. 2006 November 3, 2006;281(44):33095-106.
13. Kalousi A, Mylonis I, Politou AS, Chachami G, Paraskeva E, Simos G. Casein kinase 1 regulates human hypoxia-inducible factor HIF-1. *Journal of Cell Science*. 2010 September 1, 2010;123(17):2976-86.

14. Dengler VL, Galbraith MD, Espinosa JM. Transcriptional regulation by hypoxia inducible factors. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*. 2014 Jan-Feb;49(1):1-15. PubMed PMID: 24099156. Pubmed Central PMCID: 4342852.
15. Flotho A, Melchior F. Sumoylation: a regulatory protein modification in health and disease. *Annual review of biochemistry*. 2013;82:357-85. PubMed PMID: 23746258.
16. van der Veen AG, Ploegh HL. Ubiquitin-like proteins. *Annu Rev Biochem*. 2012;81:323-57. PubMed PMID: 22404627.
17. Andreou AM, Tavernarakis N. SUMOylation and cell signalling. *Biotechnology Journal*. 2009;4(12):1740-52.
18. Mahajan R, Delphin C, Guan T, Gerace L, Melchior F. A Small Ubiquitin-Related Polypeptide Involved in Targeting RanGAP1 to Nuclear Pore Complex Protein RanBP2. *Cell*. 1997 1/10;88(1):97-107.
19. Bawa-Khalfe T, Yeh ET. SUMO Losing Balance: SUMO Proteases Disrupt SUMO Homeostasis to Facilitate Cancer Development and Progression. *Genes & cancer*. 2010 Jul;1(7):748-52. PubMed PMID: 21152235. Pubmed Central PMCID: 2998238.
20. Lyst MJ, Stancheva I. A role for SUMO modification in transcriptional repression and activation. *Biochemical Society transactions*. 2007 Dec;35(Pt 6):1389-92. PubMed PMID: 18031228. Pubmed Central PMCID: 2871292.
21. Verger A, Perdomo J, Crossley M. Modification with SUMO. A role in transcriptional regulation. *EMBO reports*. 2003 Feb;4(2):137-42. PubMed PMID: 12612601. Pubmed Central PMCID: 1315836.
22. Ross S, Best JL, Zon LI, Gill G. SUMO-1 Modification Represses Sp3 Transcriptional Activation and Modulates Its Subnuclear Localization. *Molecular Cell*. 2002 10//;10(4):831-42.
23. Goodson ML, Hong Y, Rogers R, Matunis MJ, Park-Sarge O-K, Sarge KD. SUMO-1 Modification Regulates the DNA Binding Activity of Heat Shock Transcription Factor 2, a Promyelocytic Leukemia Nuclear Body Associated Transcription Factor. *Journal of Biological Chemistry*. 2001 May 25, 2001;276(21):18513-8.
24. Girdwood DWH, Tatham MH, Hay RT. SUMO and transcriptional regulation. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2004;15(2):201-10.
25. Shiio Y, Eisenman RN. Histone sumoylation is associated with transcriptional repression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003 November 11, 2003;100(23):13225-30.
26. Nunez-O'Mara A, Berra E. Deciphering the emerging role of SUMO conjugation in the hypoxia-signaling cascade. *Biological chemistry*. 2013 Apr;394(4):459-69. PubMed PMID: 23362194.

27. Golebiowski F, Matic I, Tatham MH, Cole C, Yin Y, Nakamura A, et al. System-Wide Changes to SUMO Modifications in Response to Heat Shock. *Science Signaling*. 2009 2009-05-26 00:00:00;2(72):ra24-ra.
28. Bossis G, Melchior F. Regulation of SUMOylation by Reversible Oxidation of SUMO Conjugating Enzymes. *Molecular Cell*.21(3):349-57.
29. Feligioni M, Nistico R. SUMO: a (oxidative) stressed protein. *Neuromolecular medicine*. 2013 Dec;15(4):707-19. PubMed PMID: 24052421.
30. Boggio R, Colombo R, Hay RT, Draetta GF, Chiocca S. A mechanism for inhibiting the SUMO pathway. *Mol Cell*. 2004 Nov 19;16(4):549-61. PubMed PMID: 15546615. Epub 2004/11/18. eng.
31. Shao R, Zhang FP, Tian F, Anders Friberg P, Wang X, Sjoland H, et al. Increase of SUMO-1 expression in response to hypoxia: direct interaction with HIF-1alpha in adult mouse brain and heart in vivo. *FEBS letters*. 2004 Jul 2;569(1-3):293-300. PubMed PMID: 15225651.
32. Carbia-Nagashima A, Gerez J, Perez-Castro C, Paez-Pereda M, Silberstein S, Stalla GK, et al. RSUME, a small RWD-containing protein, enhances SUMO conjugation and stabilizes HIF-1alpha during hypoxia. *Cell*. 2007 Oct 19;131(2):309-23. PubMed PMID: 17956732.
33. Carbia-Nagashima A, Gerez J, Perez-Castro C, Paez-Pereda M, Silberstein S, Stalla GK, et al. RSUME, a Small RWD-Containing Protein, Enhances SUMO Conjugation and Stabilizes HIF-1α during Hypoxia. *Cell*. 2007 10/19;131(2):309-23.
34. Bae SH, Jeong JW, Park JA, Kim SH, Bae MK, Choi SJ, et al. Sumoylation increases HIF-1alpha stability and its transcriptional activity. *Biochemical and biophysical research communications*. 2004 Nov 5;324(1):394-400. PubMed PMID: 15465032.
35. Berta MA, Mazure N, Hattab M, Pouyssegur J, Brahimi-Horn MC. SUMOylation of hypoxia-inducible factor-1alpha reduces its transcriptional activity. *Biochemical and biophysical research communications*. 2007 Aug 31;360(3):646-52. PubMed PMID: 17610843.
36. Kang X, Li J, Zou Y, Yi J, Zhang H, Cao M, et al. PIASy stimulates HIF1[alpha] SUMOylation and negatively regulates HIF1[alpha] activity in response to hypoxia. *Oncogene*. 2010 10/14/print;29(41):5568-78.
37. Huang C, Han Y, Wang Y, Sun X, Yan S, Yeh ET, et al. SENP3 is responsible for HIF-1 transactivation under mild oxidative stress via p300 de-SUMOylation. *The EMBO journal*. 2009 Sep 16;28(18):2748-62. PubMed PMID: 19680224. Pubmed Central PMCID: 2750016.
38. Becker J, Barysch SV, Karaca S, Dittner C, Hsiao HH, Berriel Diaz M, et al. Detecting endogenous SUMO targets in mammalian cells and tissues. *Nature structural & molecular biology*. 2013 Apr;20(4):525-31. PubMed PMID: 23503365.

39. Eckert D, Buhl S, Weber S, Jager R, Schorle H. The AP-2 family of transcription factors. *Genome Biol.* 2005;6(13):246. PubMed PMID: 16420676. Pubmed Central PMCID: PMC1414101.
40. Li H, Sheridan R, Williams T. Analysis of TFAP2A mutations in Branchio-Oculo-Facial Syndrome indicates functional complexity within the AP-2alpha DNA-binding domain. *Human molecular genetics.* 2013 Aug 15;22(16):3195-206. PubMed PMID: 23578821. Pubmed Central PMCID: 3723307.
41. Orso F, Penna E, Cimino D, Astanina E, Maione F, Valdembri D, et al. AP-2 α and AP-2 γ regulate tumor progression via specific genetic programs. *The FASEB Journal.* 2008 August 1, 2008;22(8):2702-14.
42. Pellikainen JM, Kosma VM. Activator protein-2 in carcinogenesis with a special reference to breast cancer--a mini review. *Int J Cancer.* 2007 May 15;120(10):2061-7. PubMed PMID: 17330235.
43. Braganca J, Eloranta JJ, Bamforth SD, Ibbitt JC, Hurst HC, Bhattacharya S. Physical and functional interactions among AP-2 transcription factors, p300/CREB-binding protein, and CITED2. *J Biol Chem.* 2003 May 2;278(18):16021-9. PubMed PMID: 12586840.
44. Gaubatz S, Imhof A, Dosch R, Werner O, Mitchell P, Buettner R, et al. Transcriptional activation by Myc is under negative control by the transcription factor AP-2. *Embo j.* 1995 Apr 3;14(7):1508-19. PubMed PMID: 7729426. Pubmed Central PMCID: Pmc398238. Epub 1995/04/03. eng.
45. Ding X, Luo C, Zhou J, Zhong Y, Hu X, Zhou F, et al. The interaction of KCTD1 with transcription factor AP-2alpha inhibits its transactivation. *J Cell Biochem [Internet].* 2009 Feb 1; 106(2):[285-95 pp.].
46. Zarelli VE, Dawid IB. The BTB-containing protein Kctd15 is SUMOylated in vivo. *PLoS One.* 2013;8(9):e75016. PubMed PMID: 24086424. Pubmed Central PMCID: PMC3782465.
47. Kannan P, Yu Y, Wankhade S, Tainsky MA. PolyADP-ribose polymerase is a coactivator for AP-2-mediated transcriptional activation. *Nucleic Acids Res.* 1999 Feb 1;27(3):866-74. PubMed PMID: 9889285. Pubmed Central PMCID: Pmc148259. Epub 1999/01/16. eng.
48. Zhong L, Wang Y, Kannan P, Tainsky MA. Functional characterization of the interacting domains of the positive coactivator PC4 with the transcription factor AP-2alpha. *Gene.* 2003 Nov 27;320:155-64. PubMed PMID: 14597399. Epub 2003/11/05. eng.
49. McPherson LA, Loktev AV, Weigel RJ. Tumor suppressor activity of AP2alpha mediated through a direct interaction with p53. *J Biol Chem.* 2002 Nov 22;277(47):45028-33. PubMed PMID: 12226108. Epub 2002/09/13. eng.
50. Batsche E, Muchardt C, Behrens J, Hurst HC, Cremisi C. RB and c-Myc activate expression of the E-cadherin gene in epithelial cells through interaction with transcription factor AP-2. *Mol*

Cell Biol. 1998 Jul;18(7):3647-58. PubMed PMID: 9632747. Pubmed Central PMCID: Pmc108947. Epub 1998/06/25. eng.

51. Eloranta JJ, Hurst HC. Transcription factor AP-2 interacts with the SUMO-conjugating enzyme UBC9 and is sumoylated in vivo. The Journal of biological chemistry. 2002 Aug 23;277(34):30798-804. PubMed PMID: 12072434.

52. Bhattacharya S, Ratcliffe PJ. ExCITED about HIF. Nature structural & molecular biology. 2003 07//print;10(7):501-3.

53. Steunou AL, Ducoux-Petit M, Lazar I, Monsarrat B, Erard M, Muller C, et al. Identification of the hypoxia-inducible factor 2alpha nuclear interactome in melanoma cells reveals master proteins involved in melanoma development. Molecular & cellular proteomics : MCP. 2013 Mar;12(3):736-48. PubMed PMID: 23275444. Pubmed Central PMCID: 3591665.

54. Shi D, Xie F, Zhang Y, Tian Y, Chen W, Fu L, et al. TFAP2A regulates nasopharyngeal carcinoma growth and survival by targeting HIF-1alpha signaling pathway. Cancer prevention research. 2014 Feb;7(2):266-77. PubMed PMID: 24335623.

55. Bogachek MV, Chen Y, Kulak MV, Woodfield GW, Cyr AR, Park JM, et al. Sumoylation pathway is required to maintain the basal breast cancer subtype. Cancer cell. 2014 Jun 16;25(6):748-61. PubMed PMID: 24835590. Pubmed Central PMCID: 4096794.

56. Tempe D, Piechaczyk M, Bossis G. SUMO under stress. Biochem Soc Trans. 2008 Oct;36(Pt 5):874-8. PubMed PMID: 18793154. Epub 2008/09/17. eng.

57. Wajapeyee N, Somasundaram K. Cell cycle arrest and apoptosis induction by activator protein 2alpha (AP-2alpha) and the role of p53 and p21WAF1/CIP1 in AP-2alpha-mediated growth inhibition. J Biol Chem. 2003 Dec 26;278(52):52093-101. PubMed PMID: 14551210.

58. Li J, Xu Y, Jiao H, Wang W, Mei Z, Chen G. Sumoylation of hypoxia inducible factor-1alpha and its significance in cancer. Science China Life sciences. 2014 Jul;57(7):657-64. PubMed PMID: 24916276.